



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii



Instytut Genetyki i Biotechnologii
Prof. dr hab. Joanna Kufel
Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa

Warszawa, 09-05-2023

Recenzja pracy doktorskiej mgr Ewy Stein pt. "Rozpoznawanie cząsteczek RNA przez domenę FinO białka ProQ z bakterii *Escherichia coli*."

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Ewy Stein została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Mikołaja Olejniczaka w Pracowni Biochemii RNA, w Instytucie Biologii Molekularnej i Biotechnologii na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Mgr Stein jest pierwszą autorką artykułu w *Nucleic Acids Research* w 2020 r, którego wyniki są zawarte w dysertacji. Prowadzone przez nią badania były finansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki, KNOW Poznańskiego Konsorcjum RNA i Narodowego Centrum Badań i Rozwoju.

Praca dotyczy mechanizmu oddziaływania bakteryjnych małych RNA (sRNA) z białkami efektorowymi, które pośredniczą w ich funkcjach komórkowych w regulacji translacji i stabilności mRNA. Temat ten jest od wielu lat głównym przedmiotem badań grupy prof. Mikołaja Olejniczaka. Prowadzone do tej pory badania były skupione przede wszystkim na głównym regulatorze bakteryjnym związanym z działaniem sRNA, białkiem Hfq u *Escherichia coli*, a obecnie zostały rozszerzone o ProQ, kolejny chaperon RNA z rodziny białek posiadających domenę FinO.

Podstawą doktoratu mgr Stein stanowiły wcześniejsze doniesienia dotyczące roli tej rodziny białek u różnych organizmów prokariotycznych w regulacji ekspresji genów zależnej od oddziałujących z nimi sRNA. Ponieważ wykazano, że ProQ wiąże wiele różnych cząsteczek RNA, doktorantka postanowiła zbadać jakie są zasady rozpoznawania ligandów sRNA przez to białko. Zgodnie z przedstawionym celem badań, autorka przeprowadziła szereg eksperymentów *in vitro* mających na celu określenie siły wiązania wybranych cząsteczek RNA przez wytypowane warianty białka ProQ. Wszystkie zaprezentowane doświadczenia, które wymagały szczególnej systematyczności, zostały przeprowadzone bardzo starannie i bez zarzutu pod względem technicznym. Także interpretacja wyników jest trafna, a wyciągnięte wnioski i wykonane na ich podstawie kolejne analizy są w pełni uzasadnione. Takie podejście umożliwiło uzyskanie konkretnych odpowiedzi na stawiane pytania. Dzięki temu praca tworzy logiczną i przemyślaną całość, która stanowiła podstawę publikacji w *Nucleic Acids Research*.

W swojej pracy mgr Stein skupiła się na dwóch głównych aspektach związanych z oddziaływaniem ProQ-sRNA, a mianowicie elementach w sekwencji i strukturze cząsteczek sRNA, które przyczyniają się do specyficznego rozpoznania przez ProQ oraz znaczeniu określonych pozycji aminokwasowych w domenie FinO (czyli NTD) istotnych dla rozpoznania substratu. W tym celu, w zależności od eksperymentu, zbadała oddziaływanie wybranych cząsteczek RNA o różnej sekwencji i strukturze z białkiem pełnej długości (dla sześciu ligandów) jak i zawierającym tylko N-terminalną domenę (NTD), która jest wystarczająca do wiązania wielu substratów RNA. Oprócz tego wykorzystała też warianty NTD z

mutacjami reszt aminokwasowych potencjalnie zaangażowanych w oddziaływanie RNA-białko, wytypowanych na podstawie danych literaturowych i analizy stopnia zakonserwowania sekwencji białek z rodziny FinO. Wybrane aminokwasy znajdowały się zarówno po stronie wypukłej jak i wklęsłej w strukturze domeny NTD. Siłę oddziaływania między oczyszczonymi wariantami ProQ a cząsteczkami RNA otrzymanymi przez transkrypcję *in vitro* przy użyciu polimerazy faga T7 wyznaczano przy użyciu techniki EMSA jako stałą równowagi reakcji dysocjacji. Na podstawie uzyskanych wyników autorka wyciąga szereg wniosków, które są omówione w zwięzły i rzeczowy sposób w dyskusji, a następnie zestawione w wyczerpującym podsumowaniu. Najważniejsze z nich, i najlepiej uzasadnione, dotyczą istotnej roli struktury Rho-niezależnego terminatora i ogona oligourydynowego w rozpoznaniu ligandów sRNA przez NTD ProQ, znaczenia bogatego w adenozyiny motywu po stronie 5' terminatora w dyskryminacji cząsteczek sRNA przez ProQ i Hfq, oraz wyznaczenia kieszeni wiążącej sRNA po stronie wklęsłej domeny FinO. Kolejną ciekawą obserwacją, która wymaga dalszych badań, jest możliwość, że sposób rozpoznania ligandu przez domenę NTD jest do pewnego stopnia specyficzny dla każdego substratu, co nasuwa pytanie czy podobny tryb dotyczy też białka ProQ pełnej długości. Jedną z przesłanek sugerujących taką możliwość jest obserwacja, że wiązanie całego białka ProQ jest mniej zależne od obecności Rho-niezależnego terminatora niż ma to miejsce dla domeny NTD. Inną interesującą kwestią jest możliwość istnienia dodatkowych elementów w strukturze sRNA kompleksu sRNA/mRNA/białko pozwalających różnicowo oddziaływanie ligandów z ProQ i Hfq. Czy jest możliwe, że specyficzność lub wydajność tego oddziaływania są w jakiś sposób modulowane przez wiązanie regulowanej przez sRNA cząsteczkę mRNA? Czy było to eksperymentalnie testowane? Ostatnia uwaga, czy na podstawie uzyskanych wyników i sformułowanych wniosków można zaproponować kolejne, rozszerzone badania dotyczące mechanizmu rozpoznawania sRNA przez białka bakteryjne, szczególnie w warunkach zbliżonych do sytuacji *in vivo*? Jakimi technikami można by takie badania przeprowadzić? Jest to szczególnie istotne biorąc pod uwagę, że ProQ różni się znacząco od innych białek z tej rodziny, przede wszystkim szerokim zakresem substratów. Czym taka różnorodność substratowa może być wywołana, czy są jakieś strukturalne cechy w białku ProQ, które mogą wyjaśniać te różnice?

Uwagi krytyczne

Informacje dostarczone we wprowadzeniu, w którym omówiony jest stan dotychczasowej wiedzy, dają dobry wgląd w przebieg omawianych procesów i są wystarczające do śledzenia kolejnych etapów pracy doktorskiej, ale w tej części brakuje szerszego podejścia. Wstęp jest nieco nazbyt lakoniczny i skupiony wokół zagadnień bezpośrednio związanych z tematyką pracy, czyli na oddziaływaniu RNA z białkami Hfq i ProQ. Niektóre wątki warto byłoby rozwinąć, np. bardziej szczegółowo omówić kompleksowe działanie chaperonu Hfq w metabolizmie sRNA i mRNA, przez regulację stabilności (oddziaływanie z degradosomem), poliadenylacji (stymulacja aktywności polimerazy PAP I) i translacji (oddziaływanie mRNA z rybosomem, biogeneza i składanie rybosomu, wierność translacji). Chociaż o białkach z rodziny FinO wiadomo jest znacznie mniej, to czy są jakieś przesłanki, że również mogą mieć bardziej zróżnicowane funkcje, czy raczej głównie w regulacji translacji, jak to wynika z przykładów omówionych w pracy?

Opis wyników jest systematyczny i szczegółowy. Charakter doświadczeń przeprowadzonych w pracy wymagał zastosowania technik *in vitro*, a wykonane eksperymenty polegały głównie na wyznaczeniu stałych oddziaływań na podstawie EMSA. Przyczynia się to do pewnej powtarzalności w opisie doświadczeń i ich wyników w kolejnych rozdziałach. Należy docenić, że autorka starała się wprowadzić urozmaicenie (np. analiza konserwacji, podsumowujące tabele, które są bardzo pomocne), mimo to przeważnie schemat rozdziałów jest bardzo zbliżony. Przyznam, że sama nie wiem, jak temu zaradzić, ale może istnieje jakiś bardziej syntetyczny a jednocześnie przystępny sposób?

Dwie kolejne kwestie natury technicznej dotyczą nieścisłości w przedstawianiu informacji i danych. Konkretnie, pierwotnie w opisie reszt aminokwasowych NTD ProQ istotnych dla rozpoznania substratów,

pozycja R80 jest zaliczona do strony „wypukłej”, także na Rys. 21B w strukturze przewidzianej AlphaFold, dopiero w dyskusji pojawiają się argumenty świadczące o położeniu tej reszty po stronie „wkłęsłej”, co umożliwia zaproponowanie istnienia kieszeni wiążącej znajdującej się po tej właśnie stronie domeny NTD. Należało te informacje wprowadzić wcześniej, aby zachować spójność. Drugie niedociągnięcie, które wprowadza niejaki zamęt, to brak systematyczności w opisie cząsteczek RNA wykorzystywanych w kolejnych analizach. O ile pierwsze sześć ligandów jest przedstawione w sposób bardziej szczegółowy, to następne pojawiają się bez właściwego wprowadzenia i trudno jest zrozumieć zasadność ich zastosowania. Brakuje też jasno podanej charakterystyki tych cząsteczek z danych literaturowych, np. że MicA jest głównie rozpoznawane przez Hfq a nieco w mniejszym stopniu przez ProQ, RybB wiąże oba białka, ale silniej Hfq, a malM-3' odwrotnie, pozostałe zaś RNA są ligandami ProQ, najlepiej by to było ująć w formie tabelki, z odpowiednimi odnośnikami do publikacji.

Ostatnie zagadnienie, które budzi pewne zastrzeżenia dotyczy porównywania siły oddziaływania domeny NTD i białka Hfq z wariantami sRNA (Tabela 4). Czy wnioski uzyskane dla wyizolowanej domeny ProQ oraz pełnej długości Hfq, mają istotne znaczenie dla zrozumienia specyficzności rozpoznania substratów przez te białka, tym bardziej, że eksperymenty zostały wykonane przy użyciu innych technik? Chciałabym usłyszeć uzasadnienie celowości przeprowadzenia tych doświadczeń.

Chciałam zaznaczyć, że wymienione powyżej uwagi nie mają znaczącego wpływu na wysoką ocenę przeprowadzonych podczas doktoratu badań oraz ich prezentacji w rozprawie.

Podsumowując, mgr Ewa Stein wykonała bardzo solidną pracę doświadczalną na wysokim poziomie i wykazała się dużą dojrzałością, systematycznością i zaangażowaniem. Przeprowadzone doświadczenia są dobrze zaplanowane i stanowią spójny ciąg logiczny, zostały bardzo starannie wykonane, a otrzymane dane właściwie opracowane i przedstawione, zawarte w pracy ryciny są odpowiednio przygotowane i opisane. Interpretacja wyników jest uzasadniona i nie budzi zastrzeżeń. Ponadto, dysertacja jest napisana poprawnym językiem, w sposób jasny i zrozumiały.

Rozprawa spełnia ustawowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim, wnioskuję zatem do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne UAM o dopuszczenie pani mgr Ewy Stein do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Uwagi szczegółowe:

1. Str 18. Rys 2B. Trudno jest zorientować się gdzie dokładnie znajdują się motywy RNA rozpoznawane przez Hfq, w szczególności dotyczy to zielonego motywu (AAN)₆. Jest to dużo lepiej widoczne w pracy przeglądowej, z której Rycina została zaczerpnięta.
2. Str 18-19. Warto byłoby podkreślić, że białka oddziałujące z Hfq, RNaza E i PNPaza, są głównymi składnikami bakteryjnego degradosomu.
3. Str 19, Rys 3. W jaki sposób duplex *FinP/traJ* jest degradowany?
4. Str 49. Przy omawianiu sRNA SibA jako znanego ligandu ProQ wykorzystanego do badań w pracy należało zacytować Smirnov et al., 2016, PNAS, gdzie po raz pierwszy zostało to pokazane.
5. Str 100, Rys. 35. Obecność ryciny z wynikami oraz przedstawienie tych wyników w dyskusji. Bardziej właściwe byłoby włączenie tego dodatkowego przedstawienia danych w rozdziale wyników.
6. W miarę nieliczne błędy i niedociągnięcia językowe, których nie warto przytaczać, oprócz kilku przykładów, które są dość niezręczne lub zmieniają nieco znaczenie zdania.
„sRNA ułatwia odnalezienie się regulatora i regulowanego mRNA”.
„C-koniec” zamiast „koniec C”.

„Struktura i powierzchnie wiążące RNA białka Hfq” zamiast „Struktura i powierzchnie białka Hfq wiążące RNA. W obecnej formie zdanie sugeruje, że wiązane jest RNA kodujące białko Hfq, a nie że to Hfq wiąże RNA.

„pojedynczoniowe RNA”???

„Domenę FinO zdefiniowano jako centralną domeną białka w granicach 25-186 aminokwasu ją”

Rozpoczynanie zdania od „21,2 kDa białko FinO u *E. coli*”

„chromosomowe białko ProQ”??

„u eukariotów” powinno być „u Eukariota” lub „u eukariontów”

„fitowanie”??

UNIwersytet Warszawski
Instytut Genetyki i Biologii
Joanna Kufel
Prof. Joanna Kufel

Prof. Joanna Kufel