



UNIwersytet Warszawski
Wydział Biologii
Instytut Genetyki i Biotechnologii
ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa

Warszawa, 29-05-2016

Recenzja pracy doktorskiej mgr Zuzanny Wróblewskiej pt. "Rola białka Hfq w oddziaływaniu niekodujących RNA bakterii z sekwencją kodującą mRNA"

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Zuzanny Wróblewskiej została wykonana pod kierunkiem dr hab. Mikołaja Olejniczaka w Zakładzie Biochemii Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Mgr Wróblewska jest pierwszym autorem publikacji w *RNA* (2016), której wyniki, stanowiące podstawę dysertacji, zostały uzyskane podczas realizacji doktoratu w ramach projektu TEAM Fundacji na rzecz Nauki Polskiej.

Funkcja wielu białek wymaga ścisłej kontroli ich poziomu i aktywności w komórce, co odbywa się przez regulację transkrypcji, wydajności dojrzewania i stabilności mRNA, przebiegu translacji oraz właściwości (modyfikacje) i stabilności białka. Efektywność i precyzyjna regulacja translacji zależy m.in. od odpowiedniej struktury cząsteczki mRNA, głównie regionów 5' i 3' UTR, które umożliwiają specyficzne oddziaływanie z szeregiem czynników białkowych lub regulatorowych cząsteczek ncRNA. U bakterii, jednym z ważniejszych czynników regulatorowych jest białko chaperonowe Hfq, zaangażowane w koordynację stabilności mRNA i translacji przez małe niekodujące sRNA, które oddziałują z cząsteczkami mRNA, przeważnie z ich rejonem 5' UTR.

Tematem pracy doktorskiej mgr Zuzanny Wróblewskiej było zbadanie mechanizmu działania Hfq poprzez ułatwianie interakcji sRNA-mRNA w szczególnie interesującym przypadku, który dotyczy regulacji negatywnej, tzn. represji translacji, zachodzącej na skutek oddziaływania cząsteczek sRNA z regionem kodującym mRNA *ompD* u *Salmonella typhimurium*. W trakcie swojej pracy autorka skupiła się na badaniach metodami *in vitro* wpływu Hfq na wiązanie mRNA przez trzy z czterech sRNA, RybB, MicC i SdsR. Główne osiągnięcia wynikające z przeprowadzonych badań są zwięźle wymienione we wnioskach przedstawionych w rozprawie. Podsumowując, udało się wykazać, że Hfq specyficznie wiąże mRNA *ompD* w rejonie 5' UTR i znacząco wspomaga asocjację do *ompD* dwóch ncRNA, RybB i MicC, i w dużo

mniejszym zakresie SdsR, w sposób zależny od struktury oddziałujących RNA. Ponadto, wiązanie RybB i MicC wpływa na strukturę *ompD*, co prawdopodobnie ma znaczenie w inhibicji translacji tej cząsteczki mRNA.

W pracy zastosowano zarówno standardowe metody biologii molekularnej i biochemii, jak i specjalistyczne i zaawansowane techniki służące do analiz oddziaływania RNA-RNA i RNA-białka, takie jak EMSA, oraz podejścia funkcjonalne, np. translacja *in vitro*. Użycie tych technik było możliwe dzięki ekspertyzie dostępnej w laboratorium Mikołaja Olejniczaka oraz w Instytucie Biologii Molekularnej i Biotechnologii UAM.

Praca zawiera wszystkie niezbędne części i została przygotowana w sposób ułatwiający zrozumienie omawianych zagadnień i wykonanych badań.

W obszernym i usystematyzowanym wstępie autorka wyczerpująco i wnikliwie przedstawiła tematykę związaną z zakresem działania ncRNA i znaczenia białka Hfq w procesach regulacji ekspresji genów w organizmach bakteryjnych. Podane przykłady regulacji są bardzo zajmujące i informatywne. Ta część pracy jest obficie ilustrowana, co przyczynia się do komunikatywności i przejrzystości tekstu. Z perspektywy osoby zajmującej się zbliżoną tematyką w komórkach eukariotycznych bardzo właściwe jest porównanie budowy i funkcji białek bakteryjnych Hfq i eukariotycznych Sm/Lsm, które są przedstawicielami tej samej rodziny. Brakuje może bardzo skrótowego opisu innych aktywności regulatorowych sRNA u bakterii, m.in. na poziomie transkrypcji czy w procesach nabytej oporności (systemy CRISPR/Cas). Ponadto, opis doświadczeń dotyczących mechanizmu aktywacji translacji mRNA *rpoS* przez Hfq i DsrA jest nieco zbyt szczegółowy, podczas gdy jeszcze bardziej obszerne omówienie dla mRNA *ompD* jest w pełni uzasadnione, ponieważ jest to obiekt badawczy w przedstawionej pracy. Poza tymi uwagami nie mam zastrzeżeń dotyczących tego rozdziału.

Cele pracy są jasno i precyzyjnie sformułowane i dokładnie określają zakres planowanych doświadczeń, a materiały i metody są opisane bardzo szczegółowo i kompetentnie, aczkolwiek nieco zbyt obszernie i opisowo.

Część opisująca wyniki doświadczeń jest rozbudowana i rzeczowa. Autorka wykonała bardzo solidną pracę doświadczalną, eksperymenty zostały przeprowadzone w sposób starannie zaplanowany i skrupulatny, co powoduje, że stanowią logiczną całość. Opis wykonanych doświadczeń odzwierciedla trzy podstawowe cele pracy. Badania wiązania różnych wariantów Hfq do skróconej wersji mRNA *ompD* oraz sRNA pozwoliły ustalić, że białko to silnie i specyficznie wiąże swój substrat mRNA, głównie przez kontakt od strony dystalnej, ale również przez dodatkowe powierzchnie, natomiast z sRNA oddziałuje przez powierzchnię proksymalną.

Co ciekawe, obecność Hfq w sposób znaczący przyspiesza asocjację *ompD* z cząsteczkami sRNA RybB i MicC, a ma dużo słabszy wpływ na wiązanie SdsR. Pewnym mankamentem jest dość monotony i powtarzający się schemat opisu tych doświadczeń, co czasem powtarza się też w kolejnych rozdziałach, być może lepszym rozwiązaniem byłoby bardziej syntetyczne ujęcie omawianych przypadków. Następnie sprawdzono mechanizm działania Hfq w promowaniu interakcji sRNA-mRNA przy użyciu skróconych cząsteczek. Na podstawie tych analiz autorka wnioskuje, że wpływ Hfq na strukturę substratów jest zróżnicowany i Hfq podczas wiązania może zmieniać strukturę obu cząsteczek (mRNA i sRNA) lub tylko sRNA. Nie jestem jednak do końca przekonana, czy wnioski te są do końca uzasadnione, ponieważ są oparte na wynikach pośrednich. Aby mieć większą pewność należało potwierdzić te obserwacje w inny sposób (niestety nie umiem zaproponować konkretnego podejścia), być może z zastosowaniem specyficznych i niespecyficznych kompetytorów podczas reakcji. Z kolei analiza struktury drugorzędowej *ompD* wskazała jakie elementy strukturalne tego mRNA biorą udział w oddziaływaniu z poszczególnymi cząsteczkami sRNA. Nie wszystkie przewidziane w programie RNAstructure obszary zostały wyznaczone eksperymentalnie, szczególnie pośrednia część struktury SL3 i cała SL5 wydają się niepewne. Ponadto, nie wszystkie cięte bądź chronione miejsca zostały uwzględnione na rycinie struktury mRNA (np. cięcie przez T1 w pozycjach G138/139 i G151), co znacznie ułatwiłoby analizę wzoru mapowania RNazami i porównanie tego wzoru z modelem. Prawdopodobnie połączenie nawet niepełnych danych doświadczalnych i modelowania pozwoliło na wygenerowanie właściwej struktury, ale jednak trudno jest wyciągać wiarygodne wnioski dotyczące różnic w strukturalnych preferencjach wiązania sRNA. Znacznie bardziej miarodajne są wyniki zmian wzoru mapowania w obecności sRNA, które wskazują na rearanżacje strukturalne pod wpływem wiązania RybB i MicC, ale nie SdsR. Co ciekawe, SdsR wykazuje odmienną od pozostałych sRNA w dwóch aspektach działania, reakcji na obecność Hfq i wpływu na strukturę mRNA *ompD*. Częściowo wyjaśnia to struktura regionu SdsR oddziałującego z *ompD*, który tworzy motywy spinek i jest trudno dostępny. Czy próbowano sprawdzić, czy obecność Hfq ma wpływ na zmiany strukturalne w *ompD* wywołane przez sRNA? W następnej kolejności wykorzystano ciekawe podejście łączące reakcję wiązania Hfq do *ompD* po cięciach nukleazami do określenia dwóch rejonów oddziaływania między nimi, co zostało potwierdzone i uściślone do silnego wiązania Hfq w obszarze SL2 w kolejnych, bardziej specyficznych badaniach tych interakcji, z wykorzystaniem skróconych i zmutowanych wariantów *ompD*. Kolejne eksperymenty przy użyciu tych samych konstruktów sugerowały, że rola motywów ARN w wiązaniu Hfq i sRNA jest raczej nieznaczna, ale skoro sama autorka przyznaje, że wyniki te nie są rozstrzygające, to czy należało je umieszczać w pracy? Z kolei analiza znaczenia struktury SL2 oraz elementów Hfq była bardziej konkluzyjna i wykazała istotne znaczenie dystalnej powierzchni Hfq dla wydajnego oddziaływania sRNA z

sekwencją bogatą w reszty AU w 5' UTR *ompD*. Podsumowaniem badań strukturalnych i oddziaływania analizowanych cząsteczek był test funkcjonalny translacji *in vitro*, który sugerował, że wiązanie pełnej długości RybB faktycznie hamuje syntezę reporterowego białka *ompD-gfp*. Odwrotna zależność dla skróconego wariantu RybB-9 jest na tyle nieoczekiwana, że konieczne jest powtórzenie tych wstępnych doświadczeń oraz przeprowadzenie odpowiednich kontroli.

Warto podkreślić, że przeprowadzone liczne i szczegółowe eksperymenty wymagają dużej systematyczności, dokładności i sprawności eksperymentalnej.

Dyskusja wszystkich uzyskanych wyników jest wnikliwa, gruntowna i rzeczowa. Oprócz podsumowania rezultatów, co w zbyt dużym stopniu pokrywa się z sekcją wyników, i omówienia ich w kontekście dostępnej wiedzy literaturowej, autorka wyciąga bardziej generalne wnioski. Wskazuje, że stymulowane przez Hfq oddziaływanie mRNA *ompD* z różnymi sRNA jest zależne od strukturalnych uwarunkowań wiązania (dystans, kontekst) i jest bardziej wydajne w przypadku wiązania w regionach bardziej dynamicznych strukturalnie. Podkreśla również, że *ompD* jest pierwszym opisanym przypadkiem regulowanym przez sRNA z grupy I wiążących się z Hfq od strony proksymalnej, ale których mechanizm działania bardziej przypomina sRNA z grupy II, dla których wspomaganie oddziaływania mRNA-sRNA przez Hfq odbywa się dzięki interakcji dystalnej, a nie bocznej, strony tego białka z regionem *ompD* bogatym w AU zamiast z motywami ARN. Najciekawszy jest ostatni rozdział dyskusji poruszający funkcjonalne aspekty aktywności Hfq, które promuje oddziaływanie sRNA z mRNA niezależnie od ich mechanizmu działania, t.j. przez inhibicję translacji bądź regulację stabilności. Istotne pozostają pytania dotyczące funkcjonalnego znaczenia dodatkowego miejsca wiązania Hfq do *ompD* w rejonie kodującym do oraz możliwości jednoczesnego oddziaływania kilku sRNA z tą samą cząsteczką mRNA (czy coś jest wiadomo na ten temat?). Wydaje się, że dopiero badania strukturalne (krystalografia, NMR) mogą dostarczyć bardziej szczegółowych informacji na temat tych oddziaływań. W pracy brakuje może badań dotyczących znaczenia *in vivo* regulacji mRNA *ompD* przez sRNA przy udziale Hfq, ale zakładam, że są one zaplanowane i będą przeprowadzone w najbliższej przyszłości..

Końcowe podsumowanie jest ujęte w sposób spójny i zwięzły i pozwala na bardziej całościowe spojrzenie na osiągnięcia uzyskane w pracy.

Rozprawa jest napisana wyjątkowo poprawnie, w sposób jasny i przejrzysty, a błędy czy niezręczności językowe są naprawdę nieliczne. Dysertacja jest bardzo starannie opracowana i ujęta pod względem struktury i zawartości, a także edytorskim.

Oceniam doktorat pani mgr Zuzanny Wróblewskiej bardzo wysoko, jest to praca na bardzo dobrym poziomie i świadczy o jej dojrzałości naukowej. Praca spełnia ustawowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim, wnioskuję zatem do Rady Wydziału Biologii UAM o

dopuszczenie pani mgr Zuzanny Wróblewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Zwracam się też z wnioskiem o nagrodzenie dysertacji odpowiednią nagrodą.

Uwagi szczegółowe:

1. Strona 23, białka Lsm również mają preferencję do sekwencji bogatych w U, dlatego specyficznie wiążą prekursor transkryptów Pol III zakończone ciągiem U oraz pre-snRNA zawierające takie sekwencje.
2. Strony 37 i 65. Dlaczego długi region oddziaływania między InvR i *ompD* wykluczyła jego badanie metodami *in vitro* wykorzystanymi w pracy?
3. Strona 82. Do wyznaczenia regionów o strukturze dwuniciowej w mRNA *ompD* wykorzystano RNAzę III a nie V1, a do mapowania struktury SdsR właśnie V1, dlaczego?
4. Strona 102. W jakim celu do testów translacji *in vitro* użyto fuzji *ompD-gfp*, a nie pełnej długości *ompD* lub jego skróconej wersji? Czy sprawdzono, że ekspresja samego *gfp* nie ulega zmianom w obecności każdego ze stosowanych wariantów RybB? Wydaje się, że w obliczu niespodziewanego wyniku dla RybB-9 (Ryc. 36B) byłaby to sensowna kontrola.
5. Nieliczne błędy językowe: „trakty” urydyn zamiast ciągu urydyn, „3’ grupa hydroksylowa” zamiast grupa 3’ hydroksylowa, „3’ koniec RNA” zamiast koniec 3’ RNA, „3’-5’ egzonukleazy” zamiast „egzonukleazy 3’-5’”, „poliA polimeraza I” zamiast polimeraza I poliA, „dofitowanie danych”?; Również nieliczne błędy edytorskie, np. odnośniki w tekście do pozycji literaturowych, przeważnie (Zhang i in., 2002) a czasem (T. Soper i in., 2010).

Uzasadnienie wniosku wystąpienia o nagrodę.

Praca mgr Zuzanny Wróblewskiej przedstawia sobą dużą wartość poznawczą, a zawarte w niej wyniki zostały opublikowane w znaczącym czasopiśmie z dziedziny RNA (IF ~ 4,9). Co ważne, jest to publikacja dwuautorska, co oznacza, że większość eksperymentów została wykonana przez mgr Zuzannę Wróblewską. Sama dysertacja jest bardzo dobrze napisana i mogę stwierdzić, że wyróżnia się spośród recenzowanych przeze mnie prac.

Prof. dr hab. Joanna Kufel

