

Dr hab. Anna Kurzyńska-Kokorniak, prof. ICHB PAN
Zakład Biochemii Rybonukleoprotein

30 lipca 2021, Poznań

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Joanny Kwiatkowskiej zatytułowanej

„Mechanizm działania białka opiekuńczego Hfq w tworzeniu kompleksów pomiędzy regulatorowymi RNA MgrR i ChiX a cząsteczkami mRNA u bakterii *Escherichia coli*”

Praca doktorska Pani mgr Joanny Kwiatkowskiej została wykonana w Pracowni Biochemii RNA Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu pod opieką dr hab. Mikołaja Olejniczaka, prof. UAM. Większość danych przedstawionych w pracy doktorskiej wchodzi w skład publikacji, która ukazała się w prestiżowym czasopiśmie *RNA* i której pani mgr Joanna Kwiatkowska jest pierwszym autorem.

Problematyka pracy wpisuje się w nurt badań prowadzonych na przestrzeni ostatnich kilku lat przez prof. Mikołaja Olejniczaka i jego zespół. Badania te dotyczą mechanizmów regulacji procesu translacji przez małe regulatorowe RNA (sRNA) w komórkach bakteryjnych. Cząsteczki sRNA stanowią liczną grupę bakteryjnych regulatorów. Są one wykorzystywane w regulacji metabolizmu komórek bakteryjnych, w utrzymaniu homeostazy jonowej, adaptacji do zmieniających się warunków środowiska, czy też do obrony przed obcymi lub niepożądanymi dla bakterii elementami genetycznymi. Długość sRNA zazwyczaj mieści się w przedziale od 50 do 300 nukleotydów. Cząsteczki te różnią się między sobą sekwencją, a także przyjmowaną strukturą drugorzędową, jednakże w ich budowie można wyróżnić wspólne elementy, tj. struktury typu spinki do włosów, rozdzielone rejonami jednoniciowymi. Co istotne, sRNA cechuje występująca na długim odcinku sekwencji pełna komplementarność wobec regulowanych przez nie cząsteczek mRNA. Aktywność wielu sRNA wspierana jest przez białka opiekuńcze. Białka opiekuńcze RNA umożliwiają prawidłowe funkcjonowanie sRNA dzięki: (i) zapewnianiu tym cząsteczkom ich właściwego zwijania w struktury wyższych rzędów, (ii) ułatwianiu oddziaływania pomiędzy komplementarnymi sekwencjami sRNA i mRNA, (iii) ochronie sRNA przed komórkowymi rybonukleazami. Jednym z najlepiej poznanych białek opiekuńczych RNA u bakterii jest białko Hfq. Obecnie wiadomo, iż białko Hfq posiada trzy powierzchnie oddziaływania z RNA: proksymalną, dystalną oraz boczną. W oparciu o sposób wiązania do białka Hfq, zaproponowano podział sRNA na dwie klasy (I i II). sRNA klasy I oddziałują ze stroną proksymalną Hfq za pomocą ogona poli(U), który mieści się na końcu 3' sRNA oraz z powierzchnią dystalną Hfq, wykorzystując wewnętrzne motywy sekwencyjne bogate w reszty urydyn i adenozyń. Cząsteczki mRNA regulowane przez sRNA klasy I wiążą się do strony dystalnej Hfq za pomocą motywów sekwencyjnych ARN (A – adenozyń, R – puryna, N -

dowolny nukleotyd). Podczas gdy sRNA klasy II oddziałują z powierzchnią proksymalną i dystalną Hfq, mRNA wiąże się do strony bocznej tego białka opiekuńczego.

W ramach realizacji pracy doktorskiej pani Joanna Kwiatkowska zbadła wpływ białka Hfq na asocjację dwóch cząsteczek należących do klasy II sRNA, MgrR oraz ChiX, do regulowanych przez nie mRNA, odpowiednio *eptB* lub *ygdQ* i *chiP*. Wspomniane mRNA kodują białka zaangażowane w ścieżki przekazywania sygnału ze środowiska zewnętrznego do wnętrza komórki bakteryjnej. Wyjaśnienie mechanizmów wspieranej przez białko Hfq asocjacji sRNA-mRNA jest istotne dla lepszego poznania i zrozumienia zależnej od sRNA regulacji ekspresji genów w komórkach bakteryjnych oraz sposobu adaptacji bakterii do zmieniających się warunków środowiskowych.

Przedłożona do oceny praca doktorska zawiera wszystkie niezbędne części. W obszernym wprowadzeniu, podzielonym na trzy podrozdziały, pani Joanna Kwiatkowska wnikliwie przedstawiła problematykę dotyczącą regulatorowych RNA u bakterii, ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów kontroli ekspresji mRNA przez cząsteczki sRNA oraz roli tych regulatorowych RNA w funkcjonowaniu komórek bakteryjnych i ich odpowiedzi na czynniki pochodzące ze środowiska zewnętrznego. Ponadto, autorka zamieściła szereg informacji na temat białka Hfq, a także udziału tego białka w zależnej od sRNA regulacji ekspresji genów. Rozdział „Wprowadzenie” bardzo dobrze wprowadza czytelnika w tematykę badawczą rozprawy. W tej części rozprawy doktorskiej znalazłam nieliczne drobne usterki, które, z obowiązku recenzenta, wymieniam poniżej:

1. Uwaga natury ogólnej: rzeczowniki: sRNA i mRNA używane są czasami w rodzaju gramatycznym męskim, a czasami w rodzaju nijakim; np. (i) str. 18: „(...) mRNA kodujące małe toksyczne białko oddziałuje z antytoksycznym asRNA, tworząc stabilny dupleks (...)”. Moim zdaniem powinno być: (...) mRNA kodujący małe toksyczne białko oddziałuje z antytoksycznym asRNA, tworząc stabilny dupleks (...), bądź: (...) mRNA kodujące małe toksyczne białko oddziałują z antytoksycznym asRNA, tworząc stabilny dupleks (...) lub (ii) str. 23: „W tym przypadku cząsteczka sRNA naprowadza rybonukleazę na komplementarne mRNA *ptsG*, które następnie ulega degradacji (Morita i wsp., 2005)”. Moim zdaniem powinno być: W tym przypadku cząsteczka sRNA naprowadza rybonukleazę na komplementarny mRNA *ptsG*, który następnie ulega degradacji (...) lub: W tym przypadku cząsteczka sRNA naprowadza rybonukleazę na komplementarne mRNA *ptsG*, które następnie ulegają degradacji (...). Uwaga ta dotyczy także dalszych części pracy.

2. Str. 20: „(...) 3000 sparowanych par RNA”. Moim zdaniem wystarczy napisać: 3000 par RNA; w pełnym ujęciu: Badania wykorzystujące metodę oddziaływania RNA przez ligację i sekwencjonowanie (RIL-seq, ang. *RNA interaction by ligation and sequencing*), pozwalającą na mapowanie zależnych od Hfq oddziaływań sRNA z komplementarnymi mRNA *in vivo*, zidentyfikowały około 3000 par RNA.

3. Str. 42-43, dot. Rys. 15: brak odwołań w tekście do Rys. 15 D i 15 E.

4. Drobne błędy językowe, np. „3’ końca mRNA” zamiast końca 3’ mRNA, str. 43: „Reprezentatywne wyniki badań, otrzymane na podstawie technik oparte na pomiarach anizotropii fluorescencji oraz metodzie zatrzymanego przepływu (...)”, czy powtórzenia oraz brak przyimków, np. str. 49-50: „Wśród cząsteczek sRNA zaliczonych do Klasy II (Schu i wsp., 2015) szczególnie dobrze poznane są mechanizmy regulacji ekspresji ekspresji genów udziałem dwóch z nich (...)”.

Wspomniane drobne niedoskonałości nie wpływają w żaden sposób na ogólny, bardzo pozytywny odbiór omawianego rozdziału pracy.

Cele pracy zostały sformułowane jasno i precyzyjnie. Wyodrębnione cele szczegółowe dokładnie określają zakres zaplanowanych eksperymentów. Rozdział „Materiały i Metody” zawiera szczegółową listę materiałów wykorzystywanych przez doktorantkę podczas prowadzonych badań. Opisy zastosowanych technik i metod badawczych są równie wnikliwe. Bez wątpienia, opisy te umożliwią młodszym doktorantom, czy też badaczom z niezależnych laboratoriów, odtworzenie poszczególnych eksperymentów.

Rozdział opisujący wyniki doświadczeń składa się z dwóch części. Pierwsza z nich dotyczy badań nad mechanizmem, zależnej od białka Hfq, asocjacji cząsteczki sRNA MgrR do dwóch regulowanych przez tę cząsteczkę mRNA, *eptB* i *ygdQ*. Druga część opisuje badania nad mechanizmem zależnej od Hfq asocjacji sRNA ChiX do mRNA *chiP*. Opisy doświadczeń odzwierciedlają podstawowe i szczegółowe cele pracy. Pani mgr Joanna Kwiatkowska wykonała kompleksowe badania w układach *in vitro*, z wykorzystaniem otrzymanych metodą syntezy *in vitro* cząsteczek sRNA (MgrR i ChiX) i fragmentów mRNA (*eptB*133, *ygdQ*145 oraz *chiP*116, gdzie liczby oznaczają długość cząsteczki RNA); użyte zostały także warianty RNA zawierające mutacje w kluczowych dla prowadzonych badań motywach sekwencyjnych. Doświadczenia prowadzone były z wykorzystaniem oczyszczonego białka Hfq o sekwencji naturalnej (Hfq wt) i jego trzech wariantów zawierających substytucje w miejscach wiązania RNA, odpowiednio: mutanta strony proksymalnej (wariant Hfq K56A), mutanta strony dystalnej (wariant Hfq Y25D) i mutanta strony bocznej (wariant Hfq R16A). Doktorantka w swoich badaniach wykorzystwała standardowe metody biologii molekularnej i biochemii oraz techniki specjalistyczne, jak EMSA (ang. *electromobility shift assay*; technika różnicowej migracji kompleksów w żelu poliakrylamidowym), służąca do analiz oddziaływań RNA-RNA oraz RNA-białko, czy metody retencji kompleksów RNA-białko na podwójnych filtrach, służące do wyznaczania wartości stałych dysocjacji i wartości IC₅₀ dla reakcji kompetycji. Ponadto, autorka zastosowała specjalistyczny program KinTek Explorer do wyznaczenia kinetycznie preferowanych ścieżek dla przeprowadzanych reakcji asocjacji sRNA i mRNA w obecności białka Hfq i jego poszczególnych wariantów. Wszystkie eksperymenty zostały starannie zaplanowane i wykonane. Badania asocjacji sRNA-mRNA zostały poprzedzone potwierdzeniem struktur drugorzędowych badanych RNA z wykorzystaniem enzymów hydrolitycznych. Powinowactwo Hfq względem badanych RNA oraz szybkości tworzenia kompleksów sRNA-mRNA zostały określone z wykorzystaniem techniki EMSA. Dodatkowo, doktorantka przygotowała szereg eksperymentów kontrolnych, które umożliwiły przypisanie zaobserwowanym substratom i produktom reakcji (prążkom w żelach) różnych form kompleksów. Wykorzystując program KinTek Explorer, autorka przeprowadziła globalną analizę danych asocjacji sRNA MgrR do mRNA *eptB* lub *ygdQ* oraz sRNA ChiX do mRNA *chiP* w obecności białka Hfq i jego wariantów z mutacjami stron rozpoznających RNA. Przeprowadzone analizy umożliwiły doktorantce wyznaczenie kinetycznie preferowanych ścieżek dla wykonanych reakcji asocjacji.

Pomimo że cząsteczki sRNA MgrR i ChiX należą do tej samej klasy bakteryjnych regulatorów RNA (klasy II), doktorantka zauważyła, że można wskazać między nimi subtelne różnice w mechanizmach oddziaływania z docelowymi mRNA i białkiem Hfq *in vitro*. Dokładniej, wyniki badań prowadzonych przez mgr Joannę Kwiatkowską wykazały, iż wiązanie sRNA MgrR jest bardziej zależne od strony proksymalnej heksamerycznego pierścienia Hfq, niż ChiX. Natomiast boczna strona Hfq jest kluczowa dla stymulacji asocjacji sRNA do mRNA – mutacja w tym rejonie białka skutkowa

zakotwiczeniem sRNA MgrR i ChiX w obrębie białka i zaburzonym rozpoznawaniem strategicznych motywów UA w mRNA, co bezpośrednio przekładało się na słabsze tworzenie kompleksów sRNA-mRNA-białko. Co ważne, doktorantka po raz pierwszy pokazała, że dystalna strona białka Hfq jest miejscem wiązania kompetytoryowego RNA, który warunkuje uwalnianie kompleksu sRNA klasy II-mRNA od białka i tym samym pozwala na wykorzystanie Hfq w kolejnej rundzie regulacyjnej. Uzyskane wyniki pozwoliły pani mgr Joannie Kwiatkowskiej na zaproponowanie mechanizmu wspierania asocjacji sRNA MgrR do mRNA *eptB133* oraz *ygdQ145* przez białko Hfq. Doktorantka ustaliła, że motywy sekwencyjne rozpoznawane przez Hfq w sRNA MgrR oraz mRNA *eptB133* i *ygdQ145* są położone w regionach jednoniciowych cząsteczek, co decyduje o ich dostępności dla białka. Ponadto, doktorantka wykazała, iż sekwencje komplementarne w badanych cząsteczkach leżą w strukturalnie dynamicznych rejonach, co może ułatwiać ich wzajemnie oddziaływanie. Podsumowując, badania przeprowadzone przez mgr Joannę Kwiatkowską przyczyniły się do lepszego poznania biochemicznych mechanizmów leżących u podstaw tworzenia kompleksów między sRNA klasy II, regulowanymi przez dany sRNA mRNA i białkiem Hfq. Wydajna regulacja ekspresji genów poprzez sRNA jest bardzo ważna dla bakterii, ponieważ umożliwia ona szybką adaptację komórek bakteryjnych do zmieniających się warunków środowiskowych.

W tym miejscu chciałabym podkreślić, że przeprowadzone przez panią mgr Joannę Kwiatkowską doświadczenia wymagały dużej biegłości w prowadzeniu eksperymentów, a także niezwyklej systematyczności i dokładności w ich dokumentowaniu. Rozdział „Wyniki” jest, moim zdaniem, przygotowany bardzo starannie. Do tej części pracy, oprócz drobnych uwag natury językowej, mam jeden komentarz dotyczący kolejności odwołań do rysunków: po odwołaniu do Rys. 26 (str. 81), pojawia się odwołanie do Rys. 28 (str. 82), a dopiero później odwołanie do Rys. 27.

Dyskusja uzyskanych wyników jest gruntowna i wnikliwa; rozdział ten został zwieńczony zaproponowaniem ogólnego mechanizmu wyjaśniającego wspieraną przez Hfq asocjację sRNA klasy II do regulowanych przez nie mRNA, z uwzględnieniem dysocjacji kompleksu sRNA-mRNA od Hfq. Opisowi zaproponowanego mechanizmu towarzyszy dobrze przemyślany i czytelny schemat, który doskonale podsumowuje obserwacje poczynione przez autorkę.

Wnioski końcowe zostały ujęte w punktach i podpunktach. Końcowe podsumowanie umożliwia całościowe spojrzenie na osiągnięcie naukowe, zaprezentowane przez panią mgr Joannę Kwiatkowską w przedłożonej rozprawie doktorskiej.

Podsumowując, chciałabym stwierdzić, iż pani mgr Joanna Kwiatkowska przedstawiła bardzo wartościową rozprawę doktorską. Nie mam wątpliwości, iż dane zebrane podczas realizacji niniejszej pracy doktorskiej pozwolą na pełniejsze zrozumienie mechanizmów molekularnych związanych z regulacją ekspresji genów bakteryjnych poprzez sRNA. Do doświadczalnej części pracy mam następujące pytania:

1. Zgodnie z opisami zawartymi w rozdziale „Materiały i Metody”, reakcje wiązania sRNA MgrR do Hfq [(rozdział 6.2.4, str. 68-69) oraz (Rys. 24)] prowadzone były z wykorzystaniem substratu RNA, który był inkubowany w temp. 90°C przez 1 min, a następnie próba została przełożona na lód, na 5 min. Z kolei analizy szybkości asocjacji cząsteczek sRNA do mRNA w obecności białka Hfq, przeprowadzone za pomocą techniki EMSA, wykonane zostały zgodnie z następującym schematem: (i) cząsteczki MgrR, *eptB133* i *ygdQ145* inkubowano w 90°C przez 1 min, następnie przez 5 min na lodzie; (ii) cząsteczki

ChiX i *chiP116* inkubowano w 90°C przez 2 min, potem cząsteczki poddano fałdowaniu przez 10 min w RT (rozdział 6.2.8, str. 71). Dlaczego cząsteczki MgrR, *eptB133* oraz *ygdQ145* również nie zostały poddane fałdowaniu? Czy różnice te dotyczą regulatorowych motywów sekwencyjnych (i/ lub strukturalnych) występujących w badanych cząsteczkach?

2. Model przedstawiony na Rys. 50 dotyczy mechanizmu asocjacji sRNA MgrR do mRNA *eptB133* zależnego od białka Hfq, a następnie uwalniania kompleksu sRNA-mRNA poprzez związanie do Hfq kompetitorowego RNA. Model ten został sporządzony w oparciu o wyniki badań prowadzonych w warunkach *in vitro*. Jak sama doktorantka zauważa: „Należy pamiętać, że badania prowadzono w systemie *in vitro*, zatem otrzymane wyniki stanowią uproszczoną formę zjawisk występujących *in vivo*” (str. 140). Czy autorka zastanawiała się jak badany proces regulacji uwalniania kompleksów sRNA-mRNA od białka opiekuńczego może przebiegać w komórce? Jacy inni potencjalni gracze (np. inne cząsteczki RNA lub inne białka) mogą być zaangażowani w badany proces?

3. Czy, w oparciu o przedstawiony na Rys. 50 model, możemy wyobrazić sobie alternatywne terapie przeciwbakteryjne, które mogłyby posłużyć w leczeniu infekcji bakteryjnych?

4. Czy doktorantka obserwowała negatywny wpływ białka Hfq wt, lub jego wariantów, na stabilność (integralność) wiązanych sRNA w warunkach *in vitro*? Zgodnie z modelem zaproponowanym na Rys. 50, cząsteczka sRNA zagina się, aby związać się z proksymalną i dystalną stroną białka? Czy taki sRNA może „pękać” po związaniu do białka?

5. Czy doktorantka rozważała użycie innych metod do badania oddziaływań RNA-RNA, czy też RNA-białko, np. pomiar siły oddziaływań międzycząsteczkowych w czasie rzeczywistym metodą interferometrii warstwowej (BLI, ang. *Bio-Layer Interferometry*)?

Przedstawiona mi do oceny rozprawa spełnia wszystkie ustawowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim, wnioskuję zatem do Rady Wydziału Biologii UAM o dopuszczenie Pani mgr Joanny Kwiatkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, ze względu na wysoką wartość naukową zaprezentowanych wyników, które w większości zostały już opublikowane, wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej stosowną nagrodą.

Anna Kurzyńska-Kokorniak