



Warszawa, 31 maja 2016

Prof. dr hab Magdalena Rakowska-Boguta
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

Recenzja pracy doktorskiej Zuzanny Wróblewskiej

„Rola białka Hfq w oddziaływaniu niekodujących RNA bakterii z sekwencją kodującą mRNA”

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Zuzanny Wróblewskiej została wykonana pod kierunkiem prof. Mikołaja Olejniczaka. Kierowany przez niego zespół od kilku lat zajmuje się badaniem mechanizmu regulacji translacji przez małe niekodujące RNA w komórkach bakteryjnych. Recenzowana praca doktorska dotyczy *trans*-RNA (sRNA), które wiążą częściowo komplementarne regiony kontrolowanej przez siebie cząsteczki mRNA zmieniając dostępność mRNA do rybosomu i podatność mRNA na degradację. sRNA mają zwykle około 50-100 nt długości i są złożone ze struktur spinkowych rozdzielonych regionami jednoniciowymi. Bakterie używają szerokiego spektrum sRNA w regulacji metabolizmu komórkowego, adaptacji do zmieniających się warunków środowiska, wirulencji szczepów chorobotwórczych oraz obronie przeciwko bakteriofagom lub mobilnym elementom genetycznym. Znaczna większość sRNA wymaga do działania białka opiekuńczego Hfq i właśnie rola Hfq w tworzeniu oddziaływań między sRNA a regulowanym przez nie mRNA jest tematyką recenzowanej rozprawy. Większość danych przedstawionych w pracy doktorskiej wchodzi w skład publikacji, która ukazała się ostatnio w prestiżowym czasopiśmie *RNA Journal* i której mgr Zuzanna Wróblewska jest pierwszym autorem.

Regulacja translacji bakteryjnej przez sRNA i rola białka Hfq została wyczerpująco omówiona we wstępie teoretycznym. Układ wstępu jest logiczny i stanowi doskonałe wprowadzenie do zagadnienia. Autorka nawiązuje do najnowszych publikacji z tej żywo rozwijającej się dziedziny wiedzy. Analizowane przez nią zagadnienie nie jest proste, gdyż funkcja Hfq jest kompleksowa i polega między innymi na rozplataniu złożonych struktur drugorzędowych mRNA i sRNA, co umożliwia formowanie dupleksu między nimi. Poprzednie badania pokazały, że jedna ze stron tego białka o pierścieniowatym kształcie jest specyficzna wobec urydyn, a druga wobec adenozyń. Sekwencje bogate w urydyny obecne są na 3' końcu sRNA, co jest wynikiem terminacji transkrypcji niezależnej od Rho. Natomiast sekwencje bogate w adenozyń często występują w obrębie 5' UTR regulowanych mRNA. W ten sposób sRNA i mRNA wiążą się jednocześnie do białka Hfq, które ponadto stymuluje uformowanie dupleksu. Powszechność takiego modelu oddziaływania Hfq została niedawno zakwestionowana gdyż wykryto alternatywne sposoby oddziaływania RNA z Hfq, również z wykorzystaniem strony bocznej białka. Różnorodność oddziaływań pozwala na szybką wymianę RNA pozostających w kompleksie z Hfq i zapewnia wydajny sposób regulacji translacji w odpowiedzi na zmieniające się warunki. We wstępie szczegółowo omówiono regulację ekspresji mRNA *rpoS* przez DsrA sRNA, jedyny do tej pory poznany mechanizm działania białka Hfq w aktywacji translacji mRNA przez sRNA.

Podsumowanie wyników

W ramach realizacji pracy doktorskiej Zuzanna Wróblewska zbadła rolę białka Hfq w tworzeniu oddziaływań między sRNA a mRNA *ompD* z *Salmonella typhimurium*. W obrębie sekwencji kodującej mRNA *ompD* oddziałuje z czterema różnymi sRNA: RybB, SdsR, MicC i InvR. Uzyskane przez doktorantkę wyniki stanowią kompleksową analizę oddziaływania 5' końcowego fragmentu mRNA *ompD* o długości 187 nt z RybB, SdsR i MicC i roli Hfq w stabilizacji tych oddziaływań. Doktorantka wykonała wielostronne i kompletne badania w układzie *in vitro* z wykorzystaniem zsyntetyzowanych sRNA, fragmentu mRNA oraz oczyszczonego białka Hfq i jego zmutowanych wariantów. Szybkość tworzenia kompleksów mRNA-sRNA oraz powinowactwo Hfq względem badanych cząsteczek RNA określiła metodą różnicowej migracji w polu elektrycznym. Uzyskała eleganckie dane; zastosowanie właściwych kontroli pozwoliło na przypisanie odpowiednim prążkom na żelu różnych form kompleksów. Analiza danych pozwoliła na określenie wpływu Hfq na szybkość asocjacji kompleksów sRNA-mRNA. Stwierdzono, że białko Hfq ułatwia oddziaływania wszystkich trzech badanych cząsteczek sRNA z mRNA *ompD*, jednak dokładny sposób jego działania w każdym przypadku zależy od sekwencji oraz struktury oddziałujących cząsteczek RNA. Stosunkowo najmniejszy wpływ Hfq obserwowano w przypadku tworzenia kompleksów SdsR-*ompD*.

Doktorantka potwierdziła alternatywne sposoby oddziaływania RNA z Hfq; wyniki wskazywały, że cząsteczka mRNA może jednocześnie oddziaływać z więcej niż jedną powierzchnią białka Hfq.

Dodatkowo, przeprowadzając hydrolizę znakowanego RNA z wykorzystaniem enzymów specyficznych wobec rejonów jedno i dwuniciowych, wyznaczyła strukturę drugorzędową sekwencji liderowej *ompD* mRNA i wykazała zmiany konformacyjne w tej strukturze wywołane wiązaniem RybB i MicC. Stwierdziła także, że sekwencja bogata w reszty adenozyń i urydyn zlokalizowana w regionie 5' UTR mRNA stanowi funkcjonalne miejsce wiązania Hfq i ma kluczowe znaczenie dla zależnego od białka Hfq tworzenia kompleksów sRNA z sekwencją kodującą mRNA. Wykorzystanie krótkich, nieustrukturyzowanych fragmentów sRNA i mRNA wskazywało, że funkcjonalność innych miejsc wiązania Hfq zależy od ich położenia w strukturze, sekwencji a także orientacji względem miejsca wiązania sRNA. Przedstawione dane są wysokiej jakości i zostały opublikowane w *RNA Journal*, co potwierdza ich wysoką rangę.

W końcowej partii pracy doktorantka analizowała wpływ związanego sRNA RybB na *in vitro* translację OmpD przeprowadzoną w bakteryjnym ekstrakcie. Wyniki te potraktowano jako wstępne i choć zostały skomentowane, trudno je odnieść do podstawowej części pracy. Badania te nie zostały uwzględnione w publikacji w *RNA Journal* i wymagają kontynuacji. Dopiero analiza wpływu sRNA i Hfq na wydajność translacji pełnej długości mRNA pozwoli na eksperymentalną weryfikację wyników uzyskanych przez doktorantkę w układzie modelowym. Należy jednak przyznać, że uzyskane wyniki pozostawały w zgodzie z wnioskami wyciągniętymi z dotychczasowych badań wpływu Hfq na ekspresję mRNA zależną od sRNA w układzie *in vivo*.

Komentarz merytoryczny

Recenzowana praca reprezentuje wysoki poziom merytoryczny badań z dziedziny podstawowej biologii molekularnej. Podejmuje aktualny, bardzo istotny problem naukowy kontroli ekspresji genów bakteryjnych przez małe regulatorowe RNA. Badany przez doktorantkę mRNA OmpD koduje porynę zewnętrzną błony komórkowej, która odgrywa kluczową rolę dla odporności *Salmonella* na toksyny i antybiotyki oraz ma znaczenie dla

wirulencji bakterii. Regulacja ekspresji OmpD pozwala na szybką odpowiedź na zmieniające się warunki środowiska i wpływa na przeżywalności bakterii w komórkach gospodarza i wywołanie infekcji. Zrozumienie molekularnych mechanizmów regulacji translacji zależnej od RNA u bakterii *Salmonella typhimurium*, które są poważnymi zagrożeniami zdrowotnymi człowieka, może mieć istotne znaczenie dla zaprojektowania nowych dróg terapii infekcji bakteryjnych.

Koncepcja pracy jest spójna, eksperymenty są zaplanowane logicznie, tak aby podejść do rozwiązania problemu specyficzności oddziaływań w każdy możliwy sposób – od strony mRNA, sRNA, ale także od strony białka Hfq. Wykonanie eksperymentów jest perfekcyjne, opracowanie jest staranne, a komentarze właściwie wyważone. Wnioski i hipotezy postawione na podstawie uzyskanych wyników są w pełni uzasadnione.

Mam tylko nieliczne zastrzeżenia, które nie umniejszają mojej pozytywnej opinii o recenzowanej pracy.

1. We wstępie teoretycznym nawiązano do funkcji Hfq w regulacji translacji niezależnej od sRNA. Potraktowano jednak marginalnie szeroko opisane w literaturze oddziaływanie Hfq z 3' końcem mRNA, co promuje poliadenylację i hamuje aktywność 3'-5' egzonukleaz. Czy w układzie *in vivo* udział białka Hfq w dojrzewanie 3' końca może mieć wpływ na efektywność oddziaływań sRNA-mRNA w obrębie 5' końca tego mRNA ?
2. Czy przedyskutowano wyczerpująco możliwość wykorzystania stosowanego w pracy modelu do sytuacji *in vivo* w komórce? Z literatury wiadomo o istnieniu zjawiska konkurencji między sRNA o wiązanie do Hfq, co może wpływać na proces potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów. Zjawisko kompetycji wynika z obserwacji, że poziom białka Hfq w komórce nie jest wystarczający by pośredniczyć we wszystkich oddziaływaniach mRNA-sRNA. W układzie *in vitro* autorka stosowała różne stężenia Hfq. Odnoszę wrażenie, że efekt stężenia Hfq na oddziaływanie z badanymi RNA nie został dostatecznie przedyskutowany w kontekście sytuacji *in vivo*.
3. W podsumowaniu wyników/dyskusji zabrakło mi końcowego modelu przedstawiającego miejsca wiązania Hfq i jego wpływ na asocjację badanego fragmentu mRNA ompD z cząsteczkami sRNA i konfrontacji z opublikowanym modelem przedstawionym na rys. 8.

Komentarz edytorski

Praca została przygotowana starannie. Część teoretyczna jest przygotowana bardzo kompetentnie i doskonale wprowadza w tematykę badań. Opis poszczególnych partii wyników poprzedzony jest zwykle krótkim wprowadzeniem teoretycznym i podsumowany konkluzją, ułatwiając zrozumienie opisywanych eksperymentów, które układają się w ciąg logiczny. Dyskusja jest bardzo wyważona, konkluzje nie są posunięte za daleko.

Podsumowanie

Podsumowując, uważam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska w pełni spełnia wymogi ustawy o Tytule i Stopniach Naukowych i wnoszę do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Zuzanny Wróblewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na wysoka jakość wyników wnioskuję o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.

M. Bogucki