

Prof. dr hab. Edward Darzynkiewicz
Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki Dośw.
Wydział Fizyki, Uniwersytet Warszawski
Tel. 691 392 320
Email: edek@fuw.edu.pl

Warszawa, 25.08.2020

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Szpotkowskiej pt. „Region terminalny 5' mRNA p53 u myszy: struktura i funkcja”

Białko p53 jest transkrypcyjnym faktorem komórkowym odpowiedzialnym za regulację syntezy genów uczestniczących m.in. w odpowiedzi na stres komórkowy, regulację cyklu komórkowego, apoptozę, starzenie komórek oraz metabolizm komórek macierzystych i metastazę. Ze względu na swój wielofunkcyjny charakter jest ono od wielu lat bardzo intensywnym obiektem badawczym, zarówno od strony czysto poznawczej, jak też medycznej. O ile samo białko ludzkie jak też jego matrycowy mRNA jest dość szczegółowo poznany, o tyle jego odpowiednik myszy, będący bardzo ważnym obiektem modelowym, pozostawia szereg niewyjaśnionych dotychczas kwestii. Pani mgr Joanna Szpotkowska w swojej pracy doktorskiej zajęła się kompleksową analizą strukturalną i funkcjonalną niekodującego regionu terminalnego 5' mRNA p53 u myszy. Jak wiadomo, zarówno sama długość 5'UTR, jak też struktura I-rzędowa (sekwencja nukleotydowa), II-rzędowa oraz samo zakończenie (tzw. kap) – wszystkie powyższe elementy w każdym mRNA mają ogromne znaczenie w regulacji biosyntezy białka (translacji) poprzez oddziaływanie z odpowiednimi czynnikami translacyjnymi.

Recenzję rozprawy postaram się przedstawić w sposób chronologiczny, poczynając od „Wprowadzenia” i „Wstępu literaturowego”; obie części zawarte w sumie na 36-ciu stronach rozprawy. Krótkie, jednostronicowe „Wprowadzenie” daje czytelnikowi krótki rys historyczny odkryć, poczynając od odkrycia p53 w 1979 r. jako białka oddziałującego z antygenem T wirusa SV40. Od tego czasu do chwili obecnej trwają intensywne badania nad genem *TP53* i jego zmutowanymi formami, odpowiedzialnymi m.in. za rozwój szeregu nowotworów. Badania powyższe prowadzą do przypisania roli p53 jako supresora nowotworowego. Taki bardzo skrótowy opis jest dobrym wstępem, szczególnie dla czytelnika niekoniecznie zorientowanego w temacie, do rozbudowanego „Wstępu literaturowego”. Nie jest rolą recenzenta streszczanie zawartego we „Wstępie” materiału, natomiast jego lektura daje obraz wszechstronnej wiedzy i umiejętnego poruszania się Doktorantki w literaturze dotyczącej badań nad genami *Trp53* - mysiego i ludzkiego. Cytowania obejmują ok. 250 oryginalnych prac, ich większość zawarta jest we „Wstępie”. Opis literaturowy ma charakter kompleksowy, obejmujący zarówno badania ściśle biologiczne oraz genetyczne, jak również strukturalne i termodynamiczne. Uważam, że po drobnych modyfikacjach, może on być podstawą do przygotowania pracy przeglądowej do dobrego czasopisma o zasięgu międzynarodowym.

Zasadniczą częścią rozprawy jest rozdział zatytułowany: „Wyniki i dyskusja”, zawarty na 73-ch stronach, a poprzedzony prezentacją „Celu pracy”. Doktorantka

postawiła sobie ambitny plan przeprowadzenia kompleksowej analizy strukturalnej i funkcjonalnej regionu terminalnego 5' mRNA p53 myszy, począwszy od określenia jego długości w oparciu o reakcję 5' RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) z trzech źródeł: 11-dniowych embrionów oraz z grasicy i wątroby. Wykazała sporą rozbieżność w długości regionu 5'UTR: od 58 do 247 nukleotydów ze zdecydowaną przewagą długości 122 nt. Transkrypty: mRNA zawierający 5'UTR o długości 122nt oraz z najdłuższym 5'UTR (247 nt), zostały poddane mapowaniu w oparciu o metodę cięć indukowanych przy udziale Pb^{2+} , technikę SHAPE (*Selective 2'-Hydroxyl Acylation Analyzed by Primer Extension*) oraz metodę opartą na modyfikacji siarczanem dimetylu. Pani mgr Szpotkowska nie ograniczyła się do badań strukturalnych regionu 5'UTR jedynie *in vitro*, ale rozszerzyła je, wykorzystując metodę z DMS, na badania *in vivo* (*in cellulo*) w transfekowanej linii komórkowej mysich fibroblastów. Szczegółowa analiza uzyskanych danych pozwoliła Autorce na zaproponowanie struktur dla końców 5'UTR zarówno o długości 122 nt jak też 247 nt, w pierwszym przypadku występowanie pięciu struktur typu spinki do włosów, w drugim siedmiu. Prawidłowość ta zachowana jest zarówno w warunkach *in vitro* jak też w materiale komórkowym, *in cellulo*. Dopelnieniem tych badań była analiza krótkich odcinków oligorybonukleotydowych o sekwencjach odpowiadających zaproponowanym wcześniej trzem fragmentom strukturalnym typu spinki do włosów (tzw. „podejście domenowe” oparte na „fragmentach izolowanych”). W wyniku tych badań uzyskano pełną zgodność obydwu podejść.

Wyróżnionym elementem struktury 5'UTR, który został przez Doktorantkę poddany szczegółowej analizie strukturalnej, był fragment silnie zachowawczy ewolucyjnie, występujący w ludzkim mRNA (U41:U81) w postaci spinki do włosów, do którego wiążą się białka HDM2 i HDMX. Jednak pomimo zachowawczości, w jego odpowiedniku mysim, Autorka w oparciu o analizę *in silico* wykazała występowanie dwóch krótkich (U41:A66 i G68:C80) stabilnych termodynamicznie struktur spinki. Dalsza analiza, wykorzystująca mapowanie dostępności 5'UTR mysiego mRNA do hybrydyzacji sześci nukleotydowych oligonukleotydów DNA oraz podatności cięcia tych hybryd przez RNazę H, pozwoliła na zaproponowanie dla mysiego 5'UTR p53 elementu strukturalnego - pojedynczej spinki, analogicznej do tej, jaka jest w 5'UTR p53 człowieka.

Innym regionem 5'UTR mysiego mRNA p53 poddanym analizie strukturalnej, którego wybór był podyktowany przesłankami literaturowymi, był terminalny fragment 5'mRNA (-166). W wyniku swoich badań Pani mgr Szpotkowska zaproponowała występowanie w sumie siedmiu elementów strukturalnych typu spinki do włosów, w tym pięciu dość dobrze odpowiadających obecnym w 5'mRNA(-122) oraz dwie charakterystyczne dla 5'mRNA(-166).

Kolejne badania dotyczyły wyznaczenia struktur trzeciorzędowych oraz parametrów termodynamicznych wybranych fragmentów mysiego mRNA p53 w oparciu o modelowanie za pomocą programu RNA Composer, metodę SAX oraz spektroskopię CD. Tak zaproponowane kompleksowe podejście umożliwiło uzyskanie interesujących wyników, dopełniających dane uzyskane z badań nad strukturami drugorzędowymi. Autorka zaobserwowała dużą zgodność parametrów termodynamicznych wyznaczonych eksperymentalnie z wyznaczonymi teoretycznie dla większości badanych fragmentów RNA. Szczególnie interesujące jest zaproponowanie na podstawie badań SAX dla 5'UTR mysiego mRNA p53 modelu

wydłużonej pałeczki. Zarówno wszystkie dane liczbowe, jak też zaproponowane struktury trzeciorzędowe, zostały przejrzyście zaprezentowane w rozprawie, w postaci odpowiednich tabeli oraz figur. Sam opis badań oraz równoległe przeprowadzona dyskusja odzwierciedla dogłębną znajomość Doktorantki z zakresu stosowanych nietrywialnych metodologii oraz dojrzałość naukową w interpretacji wyników.

Równoległym do badań strukturalnych etapem była próba korelacji aktywności translacyjnej mRNA p53 myszy w zależności od określonych elementów strukturalnych stanowiących ich 5'UTR-y. Wiadomo bowiem, że inicjacja translacji zależna jest od długości i struktury (I, II i III-rzędowej) końca 5'UTR oraz obecności, lub nie, terminalnego kapu (m^7GpppG). W tym celu konstrukty mysiego mRNA p53 z UTR o długości 122 nt oraz 247 nt poddawano translacji *in vitro* w układzie lizatu z retikulocytów królika i badano stopień wbudowania znakowanej metioniny w obecności wzrastającego stężenia analogu kapu, m^7GpppG . Okazało się, że translacja transkryptu z krótszym końcem 5' nie ulegającym translacji jest silnie zależna od kapu, natomiast translacja transkryptu posiadającego 5'UTR o długości 247 nt jest stosunkowo słabo zależna od struktury kapu. Dodatkowo, badanie kontrolne z transkrytem z 5'UTR o długości 166 nt wykazało zależność jego translacji od kapu. Na zamieszczonych w pracy graficznych wykresach (Rys. 38 i 39) zwraca uwagę fakt stosunkowo wysokiego, nieoczekiwanego wzrostu efektywności translacji przy niskich stężeniach analogu, szczególnie widoczny w przypadku mRNA p53(-247). Nie znalazłem w tekście rozprawy próby interpretacji tego wyniku. Natomiast zróżnicowaną zależność efektywności translacji pomiędzy transkryptami mRNA, krótszym i dłuższym, Doktorantka tłumaczy dominującym udziałem w tym drugim przypadku mechanizmu translacji niezależnej od kapu, a mianowicie rolę elementu IRES (*Internal Ribosomal Entry Site*) w procesie, co wydaje się zrozumiałe, zważywszy na bardziej rozbudowaną strukturę 5'UTR(-247).

Kolejne zadanie dotyczyło weryfikacji udziału kodonów inicjacyjnych AUG1 i AUG2 obecnych w mysich transkryptach mRNA 5'UTR(-122) i mRNA 5'UTR(-247) w syntezie obu izoform białka – krótszej i dłuższej, kodowanych przez oba te transkrypty. W tym celu Autorka posłużyła się mutagenezą ukierunkowaną, która pozwoliła na wykazanie udziału obydwu kodonów w syntezie białka *in vitro* (RRL) oraz *in cellulo* (komórki MB352), przy dominującym udziale kodonu drugiego (AUG2), zlokalizowanego w obrębie optymalnego kontekstu Kozak.

Innym zagadnieniem było sprawdzenie wpływu stresu genotoksycznego i siateczki śródplazmatycznej na efektywność syntezy transkryptów mRNA p53 oraz białka w komórkach linii NIH3T3 hodowanych na pożywkach z różnymi czynnikami stresowymi. W wyniku tych badań Autorka wykazała, że regulacja aktywności białka p53 w odpowiedzi na stres zachodzi głównie na poziomie translacji przy stosunkowo niezmiennym poziomie syntezy mRNA. Chciałbym podkreślić bogaty zakres technik, jakimi posłużyła się Doktorantka, obejmujący m.in. cytometrię przepływową, Western blot czy RT-PCR.

Ostatni podrozdział „Wyników i dyskusji” poświęcony jest analizie zachowawczości ewolucyjnej poszczególnych nukleotydów w strukturach drugorzędowych regionów terminalnych mysiego 5'mRNA(-122) oraz 5'mRNA(-247), w oparciu o badania 11-tu gatunków ssaków. Celem tych badań było wskazanie

rejonów odpowiedzialnych za potencjalne oddziaływania z białkami funkcyjnymi. Posługując się analizą *in silico* oraz w oparciu o program RBPmap, Autorka wskazała 24 białka, które z dużym prawdopodobieństwem mogą oddziaływać z określonymi sekwencjami badanych 5'mRNA(-122) i 5'mRNA(-247). Większość tych białek uczestniczy w szeregu kluczowych procesów związanych z regulacją ekspresji genu, m.in. w translacji mRNA, kontroli stabilności mRNA, transkrypcji, splicingu, edycji mRNA, transporcie wewnątrzkomórkowym mRNA, nowotworzeniu itd. Wartość naukowa tych badań polega m.in. na stworzeniu bazy teoretycznej, która może być bardzo pomocna przy weryfikacji eksperymentalnej mechanizmów oddziaływań białko-RNA i ich udziału w procesach komórkowych związanych z rolą mRNA p53.

Osobny rozdział rozprawy poświęcony jest „Materiałom i metodom” (21 stron). Jestem pod dużym wrażeniem bogactwa metod i zastosowanych przez Doktorantkę podejść badawczych. Doliczyłem się aż 26-ciu technik badawczych, od typowo komórkowych i z inżynierii genetycznej, poprzez całe spektrum badań biofizycznych i obliczeniowych. Ten na wskroś interdyscyplinarny charakter rozprawy stanowi m.in. o jej wysokiej wartości. Wymiernym dotychczasowym efektem badań są trzy oryginalne publikacje, z których w dwóch Pani mgr Joanna Szpotkowska jest pierwszym autorem, kilka doniesień konferencyjnych oraz obszerny materiał badawczy będący na etapie przygotowania do opublikowania.

Reasumując, rozprawę Pani mgr Joanny Szpotkowskiej oceniam bardzo wysoko i wnioskuję do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów obrony. Jednocześnie, ze względu na wyjątkową merytoryczną dojrzałość pracy, jej przejrzystość, interdyscyplinarny charakter oraz umiejętne wkomponowanie badań własnych w aktualny stan wiedzy światowej, proponuję przyznanie wyróżnienia.


Prof. dr hab. Edward Darzynkiewicz