

Poznań, dnia 26.08.2020

Dr hab. Marek Żywicki  
Zakład Biologii Obliczeniowej  
Wydział Biologii  
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

### **Recenzja pracy doktorskiej mgr Joanny Szpotkowskiej pt. „Region terminalny 5' mRNA p53 u myszy: struktura i funkcja”**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Joanny Szpotkowskiej wykonana została pod kierunkiem prof. Jerzego Ciesiołki w Zakładzie Biochemii RNA Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, w którym od wielu lat prowadzone są badania dotyczące roli elementów regulatorowych zlokalizowanych w różnorodnych cząsteczkach RNA. Przedstawiona praca skupia się na charakteryzacji strukturalnej i funkcjonalnej mRNA kodującego białko p53 u myszy.

Głównymi celami pracy doktorskiej były:

- identyfikacja izoform mRNA p53 powstających w wyniku aktywacji alternatywnych miejsc inicjacji transkrypcji
- dogłębna charakteryzacja elementów strukturalnych występujących w obrębie rejonu 5' mRNA kodującego białko p53 u myszy
- określenie dominującego mechanizmu inicjacji translacji mRNA p53 u myszy
- zbadanie sposobu regulacji ekspresji białka p53 u myszy

W wyniku realizacji pracy wszystkie powyższe cele zostały osiągnięte.

Praca składa się z 7 rozdziałów. We wprowadzeniu przedstawiony został zwięzły rys historyczny badań nad białkiem p53 oraz najistotniejsze informacje na temat jego roli, stanowiąc odpowiednie wprowadzenie do dalszej części tekstu. W kolejnym rozdziale, stanowiącym wstęp literaturowy, opisany został obecny stan wiedzy na temat struktury oraz ekspresji mysiego oraz ludzkiego genu *Trp53*. Szczegółowo opisane zostało występowanie i funkcje poszczególnych izoform zarówno mRNA jak i białka p53. Przedstawione zostały również dostępne dane dotyczące struktury rejonu 5' mRNA, wiążących się do niego białek oraz mechanizmu inicjacji translacji z uwzględnieniem występowania alternatywnych kodonów AUG. Rozdział ten został napisany bardzo kompetentnie, w oparciu o trafnie dobraną i aktualną literaturę i stanowi doskonale wprowadzenie merytoryczne do dalszej części pracy. Trzeci rozdział stanowi przedstawienie celów pracy, po którym następuje opis uzyskanych wyników połączony z ich dyskusją. Praca kończy się zwięzłym

podsumowaniem uzyskanych wyników oraz szczegółowym opisem zastosowanych materiałów i metod, po którym umieszczona została bibliografia.

Przedstawione przez Autorkę wyniki zostały opisane w sposób zrozumiały i wyczerpujący. W pierwszej części pracy Autorka podjęła się identyfikacji wariantów rejonu 5' mRNA genu *Trp53* u myszy związanych z aktywacją alternatywnych miejsc inicjacji transkrypcji. Pomimo że u człowieka obserwowano kilka alternatywnych miejsc inicjacji, u myszy dotychczas znane było tylko jedno. W wyniku przeprowadzonych eksperymentów 5' RACE Autorka wykazała wysoką heterogenność inicjacji transkrypcji w obrębie mysiego genu *Trp53*. Zidentyfikowała również główną izoformę która różni się od poprzednio zgłoszonej w literaturze. Co więcej, występowanie poszczególnych izoform okazało się być tkankowo-specyficzne. Na podstawie uzyskanych wyników do dalszych prac wybrane zostały trzy warianty różniące się długością rejonu 5' UTR – dwie zidentyfikowane przez Autorkę oraz opisana wcześniej w literaturze.

Główna część pracy poświęcona została badaniom struktury wyłonionych wariantów rejonu 5' mRNA kodującego białko p53. Badania te zostały przeprowadzone kompleksowo, z wykorzystaniem różnorodnych technik eksperymentalnych powszechnie stosowanych do badania struktury drugorzędowej oraz trzeciorzędowej RNA (próbkiowanie strukturalne za pomocą jonów ołowiu oraz DMS, techniki SHAPE oraz SAXS, hydroliza RNazą H, analiza widm dichroizmu kołowego). Badania struktury drugorzędowej prowadzone były zarówno z wykorzystaniem pełnej długości wariantów jak i izolowanych domen strukturalnych. Uzyskane wyniki posłużyły do opracowania modeli struktury drugorzędowej trzech badanych wariantów rejonu 5' mRNA. Co ciekawe, w przypadku wariantów mRNA zidentyfikowanych przez Autorkę zaobserwowana została wysoka zgodność strukturalna w obrębie domen występujących w obu wariantach, natomiast wariant zaczerpnięty z literatury wykazywał znaczące różnice. Uzyskane modele strukturalne zostały szczegółowo porównane z modelami opracowanymi wcześniej dla ludzkiego mRNA p53. Szkoda że Autorka nie pokusiła się o zestawienie struktur obu cząsteczek, mysiej oraz ludzkiej, w formie graficznej, co znacznie ułatwiłoby śledzenie omawianych różnic.

Po uzyskaniu modeli struktury drugorzędowej Autorka podjęła się określenia parametrów struktury trzeciorzędowej dominującego wariantu (-122) oraz izolowanych domen wchodzących w jego skład za pomocą techniki SAXS oraz analizy widm dichroizmu kołowego. Techniki te pozwoliły na opisanie właściwości termodynamicznych analizowanej cząsteczki oraz zaproponowanie przybliżonego kształtu struktury trzeciorzędowej poszczególnych domen. Spośród trzech analizowanych domen, w przypadku jednej uzyskano wysoką zgodność pomiędzy modelem obliczeniowym uzyskanym *in silico* oraz strukturą *ab initio* wygenerowanych na podstawie danych z eksperymentu SAXS (C(-51):G9). Różnice obserwowane w pozostałych dwóch domenach zostały przedyskutowane i dostatecznie wyjaśnione.

W powyżej omawianej części pracy najbardziej fascynujący był wątek dotyczące określenia prawidłowej struktury rejonu U41:U81, który wykazywał potencjalną możliwość formowania dwóch alternatywnych konformacji. Autorka konsekwentnie, stosując wymienione wyżej techniki, weryfikowała tę hipotezę badawczą. Początkowo uzyskane niejednoznaczne wyniki próbkiowania strukturalnego uzupełnione zostały danymi

uzyskanymi z eksperymentów hydrolizy RNA z wykorzystaniem RNazy H i komplementarnych oligonukleotydów DNA, techniki SAXS, analizy widm dichroizmu kołowego oraz analizy zachowawczości sekwencji w obrębie 11 wybranych gatunków ssaków, pozwalając na wyciągnięcie jednoznacznych konkluzji. Rejon ten, będący u człowieka miejscem wiązania białka HDM2, okazał się przyjmować u myszy konformację tożsamą z analogicznym rejonem w ludzkim mRNA. Wątek ten doskonale obrazuje dojrzałość badawczą Autorki oraz jej umiejętność naukowego dochodzenia do wyników jednoznacznie weryfikujących postawioną hipotezę badawczą.

W kolejnej części pracy Autorka opisała wyniki eksperymentów mających na celu scharakteryzowanie wpływu długości rejonu 5' UTR na proces translacji oraz zbadanie preferencji w wykorzystaniu dwóch alternatywnych kodonów AUG występujących w mRNA p53. Na podstawie uzyskanych wyników Autorka wywnioskowała że w przypadku krótszych z badanych wariantów, (-122) oraz (-166), inicjacja translacji zachodzi w sposób zależny od kapu, natomiast dłuższy wariant (-247) podlega inicjacji translacji w sposób od niego niezależny. Wykazała również że zależna od stresu regulacja ekspresji białka p53 realizowana jest poprzez regulację aktywności translacyjnej mRNA. Co więcej, okazało się że proces translacji może być inicjowany z wykorzystaniem obu alternatywnych kodonów AUG.

W ostatniej części pracy Autorka przedstawia wyniki analizy zachowawczości sekwencji rejonu 5' mRNA kodującego białko p53 u myszy w kontekście istotności ewolucyjnej opisanych wcześniej elementów strukturalnych. Wyniki te zestawione zostały z analizą znanych motywów RNA wiążących białka zidentyfikowanych w rejonie 5' mRNA.

#### Uwagi szczegółowe:

1. W części pracy dotyczącej modelowania struktury drugorzędowej zabrakło opisu metod obliczeniowych zastosowanych do uzyskania przedstawionych modeli. Jakie narzędzia zastosowano oraz w jaki sposób w tym procesie wykorzystane zostały uzyskane eksperymentalnie reaktywności nukleotydów względem NMIA i DMS czy też podatność na hydrolizę indukowaną jonami ołowiu? Szczególnie istotne wydaje się to pytanie w kontekście modelowania rejonu U41:U81.
2. W próbkowaniu strukturalnym pierwszego z wariantów rejonu 5' analizowanego mRNA (wariant (-122)) zastosowano jony ołowiu, technikę SHAPE oraz DMS, jednak dla wariantu (-247) zastosowany już dwie techniki (jony ołowiu oraz SHAPE) a dla wariantu (-166) jedną (jony ołowiu). Jak jest uzasadnienie takiego doboru technik eksperymentalnych i czy zdaniem Autorki mogło to mieć wpływ na obserwowane różnice strukturalne w obrębie wariantu (-166)?
3. W opisie uzyskanych modeli strukturalnych często podnoszona jest kwestia dostępności strukturalnej kodonów AUG1 oraz AUG2. W tym kontekście pomocne byłoby szersze przedyskutowanie wpływu dostępności strukturalnej kodonu AUG na efektywność inicjacji translacji u eukariota.

4. W opisie modelu strukturalnego uzyskanego dla wariantu (-166) wskazane byłoby przedyskutowanie potencjalnych konsekwencji funkcjonalnych związanych z obserwowanymi różnicami strukturalnymi względem pozostałych izoform mRNA.
5. W eksperymentach mających zweryfikować wykorzystanie alternatywnych kodonów AUG w porcesie translacji zastosowano zmutowane wersje tych kodonów pozwalające na wyłączenie każdego z nich osobno. Dlaczego nie zastosowano podwójnie zmutowanego mRNA, który potwierdziłby efektywność zastosowanego podejścia?
6. Podczas analizy zachowawczości ewolucyjnej rejonu 5' mRNA p53 w kontekście zachowawczości poszczególnych motywów strukturalnych wykazano rejony które posiadają wysoce zachowawczą sekwencję. Czy przeprowadzono również analizę kowariancji w celu zgłębienia zachowawczości strukturalnej tego rejonu?

Przedstawione powyżej uwagi w żaden sposób nie umniejszają wysokiej jakości przedstawionej pracy doktorskiej. Zaprezentowane wyniki badań stanowią spójną całość, w kompleksowy sposób charakteryzując strukturę oraz funkcjonowanie rejonu 5' mRNA p53 u myszy. Zostały one opatrzone trafnymi wnioskami i wyczerpująco przedyskutowane w odniesieniu do istniejącej wiedzy, w szczególności dotyczącej rejonu 5' mRNA p53 u człowieka. Przedstawiona praca doktorska świadczy o wysokiej dojrzałości naukowej Autorki oraz stanowi cenny wkład w badania nad mechanizmami regulacji ekspresji jednego z najistotniejszych dla medycyny białek regulatorowych, białka p53. Opisane w recenzowanej pracy wyniki przyczynią się do szerszego i efektywniejszego wykorzystania myszy jako organizmu modelowego w badaniach zaburzeń ekspresji białka p53. Wyniki przedstawione w pracy prezentowane były przez Autorkę na dwóch konferencjach naukowych oraz stanowiły podstawę trzech publikacji.

**W mojej ocenie rozprawa doktorska Pani mgr Joanny Szpotkowskiej spełnia wszystkie wymagania, stawiane rozprawom doktorskim i zwracam się do Rady Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Joanny Szpotkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Poznań, 26.08.2020



Dr hab. Marek Żywicki