



prof. dr hab. Mikołaj Olejniczak

Pracownia Biochemii RNA

21 stycznia 2023, Poznań

**Recenzja rozprawy doktorskiej**

**mgr Kingi Ciechanowskiej**

**zatytułowanej „Nowe spojrzenie na domenę helikazową ludzkiej rybonukleazy Dicer i jej aktywności biochemiczne, ze szczególnym uwzględnieniem aktywności wiązania RNA”**

Praca doktorska Pani mgr Kingi Ciechanowskiej została wykonana pod opieką Pani prof. IChB dr hab. Anny Kurzyńskiej-Kokorniak w Zakładzie Biochemii Rybonukleoprotein Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Temat rozprawy doktorskiej jest związany z głównym nurtem badań laboratorium Pani promotor, jakim są właściwości białek wiążących cząsteczki kwasów rybonukleinowych.

Tematem pracy jest poznanie właściwości domeny helikazowej stanowiącej część ludzkiego enzymu Dicer. We wstępie literaturowym Doktorantka bardzo szeroko nakreśliła kontekst swoich badań. Wyjaśniła budowę i znane sposoby działania helikaz wiążących RNA, jak również opisała strukturę i właściwości białek Dicer z różnych organizmów. Dzięki temu ogólnemu wprowadzeniu na temat helikaz oraz enzymów Dicer Doktorantka mogła następnie podkreślić szczególne właściwości strukturalne domeny helikazowej z ludzkiego białka Dicer jak również omówić stan wiedzy na temat funkcji domeny helikazowej w różnych organizmach. Ogólnie wprowadzenie literaturowe jest napisane bardzo przejrzysto i logicznie i stanowi cenne kompendium wiedzy na temat struktury i funkcji helikaz oraz enzymów Dicer. Zabrakło mi jednak dokładniejszego przedstawienia sekwencji i struktury domeny helikazowej ludzkiego enzymu Dicer w formie graficznej. O ile rysunek 6 przedstawia struktury poszczególnych domen tego enzymu to są one ukazane w małej skali, a co ważniejsze brakuje opisów pokazujących np. lokalizację poszczególnych istotnych funkcjonalnie motywów sekwencyjnych. Ciekawą informacją w kontekście możliwości wiązania RNA przez tę domenę mogłoby być także pokazanie potencjału elektrostatycznego na powierzchni tej domeny.



Ciekawą obserwacją poczynioną przez Doktorantkę podczas analizy danych literaturowych jest fakt, że pomimo, że domeny helikazowe występują w enzymach Dicer z wielu organizmów to nie we wszystkich tych enzymach stwierdzono zachowanie aktywności helikazowej tej domeny, która może też pełnić inne funkcje. Obserwacja ta stanowi punkt wyjścia do badań przeprowadzonych przez Doktorantkę, które miały na celu poznanie różnych możliwych aktywności domeny helikazowej ludzkiego enzymu Dicer wobec cząsteczek RNA. Aby to osiągnąć Doktorantka przeprowadziła badania mające na celu scharakteryzowanie aktywności ATPazowej oraz helikazowej tej domeny, a także poznanie specyficzności wiązania cząsteczek RNA i stwierdzenie czy domena helikazowa może także promować oddziaływania RNA-RNA. Dodatkowo Doktorantka podjęła się identyfikacji cząsteczek RNA wiążących ludzki enzym Dicer *in vivo* i porównania RNA wiązanych przez pełnej długości enzym Dicer oraz przez enzym pozbawiony domeny helikazowej.

W pierwszym etapie badań eksperymentalnych Doktorantka sprawdziła właściwości domeny helikazowej zależne od ATP. Po pierwsze stwierdziła, że oczyszczona domena helikazowa wiąże cząsteczki ATP, przy czym wiązanie radioaktywnego ATP monitorowała metodą elektroforetyczną. Następnie pokazała, że w obecności domeny helikazowej zachodzi hydroliza ATP zależna od stężenia tego białka. Potwierdziła także specyficzność tej reakcji przez porównanie z reakcjami zachodzącymi w obecności pełnego enzymu Dicer oraz enzymu Dicer pozbawionego domeny helikazowej. Są to ważne wyniki potwierdzające, że oczyszczona domena helikazowa ludzkiego białka Dicer zachowuje aktywność enzymatyczną, co wskazuje na zachowanie przez nią prawidłowej struktury przestrzennej. Ponieważ jednak badania te miały jedynie charakter jakościowy, nie jest możliwe, na przykład, porównanie aktywności badanego białka wobec innych enzymów o podobnych właściwościach.

W kolejnym etapie badań Doktorantka podjęła się określenia specyficzności wiązania RNA przez wyizolowaną domenę helikazową enzymu Dicer, za pomocą dwóch metod, EMSA oraz BLI. Wyniki tych badań pozwoliły jej na stwierdzenie, że cząsteczki RNA o długości 20-30 nt oraz cząsteczki DNA o długości powyżej 30 nt były najsilniej wiązane przez domenę helikazową. Były to wartości  $K_d$  w zakresie mikromolowym. Chciałbym zapytać, czy tak wysokie wartości  $K_d$  są typowe dla wiązania RNA przez helikazy? Jaki zakres wartości  $K_d$  dla wiązania RNA był obserwowany dla innych helikaz RNA? Kolejne pytanie dotyczy faktu, że w przypadku badań metodą





interferometrii biowarstwowej (BLI) nie stwierdzono wystarczająco silnego sygnału dla zmierzenia wiązania krótszych cząsteczek RNA. Czy próbowano zmierzyć oddziaływania w systemie, w którym RNA jest unieruchomione na sensorze? Białko jako większa cząsteczka mogłoby dać w tej sytuacji mocniejszy sygnał wynikający z tworzenia „grubszej biowarstwy”. Ostatnie pytanie dotyczące tej części badań odnosi się do interpretacji obserwowanych form o szybszej migracji pojawiających się w zależności od stężenia białka (rozdział 2.2.3, rys. 19 i 20). Jako potwierdzenie, że nie są to produkty degradacji porównano rozdział próbek w żelach natywnych i denaturujących. Jakim zdaniem Doktorantki mogłyby być zmiany strukturalne wywołane przez helikazę w jednoniciowych RNA, które byłyby przyczyną szybszej migracji?

Ciekawym aspektem badań było także sprawdzenie przez Doktorantkę zdolności domeny helikazowej do przyspieszania dysocjacji albo do przyspieszania asocjacji komplementarnych nici RNA lub DNA. Wyniki zasugerowały niewielki udział badanego białka w tych procesach. Jednak ciekawi mnie jakie jest zdanie Doktorantki na temat tego, w jaki sposób aktywność białka w tworzeniu lub rozdzielaniu nici kwasu nukleinowego może zależeć od sekwencji i struktury badanych cząsteczek RNA lub DNA. Innymi słowy czy brak obserwacji tych aktywności można uznać za definitywną odpowiedź negatywną, czy też wynik może zależeć od tego jakie cząsteczki RNA zostały wybrane do badań? Dla przekonania co do słuszności obserwowanego wyniku negatywnego brakuje mi także kontroli pozytywnej dla tych reakcji.

Ostatnim projektem w ramach pracy doktorskiej była analiza w liniach komórkowych oddziaływań RNA z pełnej długości białkiem Dicer oraz mutantem pozbawionym domeny helikazowej metodą irCLIP po to, aby zidentyfikować cząsteczki RNA, których wiązanie przez Dicer jest zależne od domeny helikazowej. Co ciekawe wstępna analiza danych zaprezentowana przez Doktorantkę wskazuje, że usunięcie domeny helikazowej powodowało nie tylko zmniejszone wiązanie niektórych RNA w porównaniu do całego enzymu Dicer, ale także zwiększone wiązanie innych RNA do białka pozbawionego domeny helikazowej. Czy Doktorantka mogłaby przedyskutować w czasie obrony, o czym mogłoby świadczyć lepsze wiązanie niektórych RNA do enzymu Dicer pozbawionego domeny helikazowej?

Podsumowując, Pani mgr Kinga Ciechanowska wykonała badania analizujące różne aspekty działania domeny helikazowej ludzkiego enzymu Dicer. Wyniki tej



wszechstronnej analizy pozwalają na lepsze zrozumienie tego jakie aktywności posiada domena helikazowa tego enzymu, a także jakie potencjalne aspekty jej działania wymagają dalszych badań dla pełnego zrozumienia ich ewentualnego znaczenia. Doktorantka wykazała się znajomością zastosowania różnorodnych metod biochemicznych, biofizycznych oraz bioinformatycznych do analizy interesującego ją problemu badawczego, co świadczy o Jej szerokich umiejętnościach eksperymentalnych i dużej ciekawości poznawczej.

Warto podkreślić, że Doktorantka jest współautorką trzech publikacji naukowych w języku angielskim, w tym dwóch prac eksperymentalnych w czasopiśmie *Cellular and Molecular Life Sciences*, w których jest trzecią współautorką, oraz jednej publikacji przeglądowej w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences*, w której jest pierwszą współautorką. Wszystkie te publikacje dotyczą różnych aspektów funkcji enzymu Dicer oraz jego oddziaływań z cząsteczkami RNA.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.), Ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.) oraz w Sposobie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (uchwała Rady Naukowej ICHB PAN nr 99/2022/Internet z dnia 9 czerwca 2022 r.). w związku z tym wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie Pani mgr. Kingi Ciechanowskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

  
Mikołaj Olejniczak