



02.06.2023

prof. dr hab. Gracjan Patryk Michlewski

Do: Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Szczepańskiej pt. „Wybrane aspekty oddziaływań pomiędzy ludzką rybonukleazą Dicer i cząsteczkami kwasów nukleinowych”

W dzisiejszej erze badań nad genomem, poznanie procesów regulacji ekspresji genów stało się niezwykle ważnym zagadnieniem. Jednym z kluczowych odkryć w tej dziedzinie był proces interferencji RNA (RNAi). Jest to złożony mechanizm regulacji ekspresji genów, który odgrywa kluczową rolę w wielu procesach biologicznych. RNAi jest naturalnym mechanizmem, który pozwala organizmom kontrolować ekspresję genów poprzez hamowanie lub redukcję poziomu konkretnych cząsteczek RNA. Proces interferencji RNA rozpoczyna się od obecności dwuniciowego RNA. W komórkach eukariotycznych istnieją dwa główne źródła dwuniciowego RNA w komórkach: endogenny, w wyniku transkrypcji genów kodujących mikroRNA (miRNA), oraz egzogenny, pochodzący z syntetycznych małych interferujących RNA (siRNA) lub małych RNA z pętlą (shRNA) wprowadzanych do komórki. Dwuniciowy RNA ulega przetwarzaniu przez rybonukleazy klasy III - Drosha, która jest specyficzna dla pierwotnych miRNA (pri-miRNA) lub Dicer, która jest specyficzna dla prekursorów miRNA (pre-miRNA), shRNA i innych dwuniciowych RNA. Ostatecznie siRNA lub miRNA w kompleksie z białkami Argonaut (Ago), wiąże się z docelowymi cząsteczkami mRNA, powodując jego degradację lub zahamowanie translacji, w zależności od komplementarności jak również rodzaju białek Ago.

Rybonukleaza Dicer jest obecna u wielu organizmów i składa się z kilku domen. Domeny te są istotne dla funkcji enzymatycznej Dicer oraz wiązania się z innymi cząsteczkami RNA. Dicer składa się z następujących domen ułożonych kolejno: domeny helikazowej, domeny DUF283 (domena o nieznannej funkcji), domeny Platformy, domeny PAZ (Piwi Argonaut and Zwillie proteins), helisy łączącej, dwóch domen RNazowych (RIIIa i RIIIb) oraz C-końcowej domeny wiążącej dsRNA (dsRBD - domena wiążąca podwójne nici RNA). Badania strukturalne wykazują, że podczas wiązania substratu RNA dochodzi do znaczących zmian konformacyjnych, które obejmują całą cząsteczkę białka. Struktura enzymu wykazuje dużą elastyczność, co umożliwia wiązanie RNA o różnorodnej budowie, takiej jak pre-miRNA oraz shRNA. Pomimo tego, wiele pytań dotyczących struktury i funkcji Dicer pozostaje bez odpowiedzi. Jednym pytaniem jest rola domeny DUF283 w procesie cięcia substratów RNA, natomiast drugim pytaniem jest specyficzność substratowa enzymu, gdyż niektóre opublikowane prace pokazują możliwość wiązania Dicer do niekanonicznych substratów RNA.

Wcześniejsze badania wykazały, że domena DUF283 wiąże jednoniciowe RNA i DNA, a pełna długość ludzkiego Dicer wspiera parowanie komplementarnych cząsteczek kwasów nukleinowych. W ramach tej pracy doktorskiej postawiono hipotezę, że domena DUF283 jest kluczowa dla aktywności Dicer przy wiązaniu do kwasów nukleinowych. W celu weryfikacji hipotezy przeprowadzono prace strukturalno-biochemiczne dotyczące konstrukcji wariantów Δ DUF Dicer, badania aktywności RNazowej, badania aktywności wspierania parowania cząsteczek kwasów nukleinowych oraz badania komórkowe w celu identyfikacji RNA wiązanych przez Dicer. Wyniki badań wskazały na istnienie oddziaływań między hDicer a cząsteczkami RNA przyjmującymi struktury G-kwadupleksu, co jest nowym odkryciem dającym podstawy do dalszych badań nad charakterem tych interakcji.

W trakcie badań nad aktywnością enzymatyczną oraz zdolnością do wspomaganego wiązania do RNA wykorzystano dwa preparaty białkowe Dicer: Δ DUF(625-752) oraz Δ DUF(630-709). Pierwszy z wariantów, Δ DUF(625-752), oprócz domeny DUF283, został pozbawiony również fragmentów, które oskrzydłają tę domenę. Drugi wariant, Δ DUF(630-709), nie zawierał samej domeny DUF283. Natomiast, przy użyciu metody irCLIP-seq (infrared crosslinking immunoprecipitation followed by NGS sequencing), przeprowadzono badania dotyczące wpływu delekcji domeny DUF283 na zdolność wariantów Δ DUF Dicer do wiązania komórkowego RNA.

Podsumowując przeprowadzone badania, najważniejsze rezultaty obejmują potwierdzenie wpływu domeny DUF283 Dicer na proces cięcia pre-miRNA oraz niezbędność tej domeny dla aktywności Dicer wspomagającej parowanie cząsteczek kwasów nukleinowych. Wykazano różnice w pulach komórkowych RNA wiązanych przez różne warianty Dicer, co sugeruje udział domeny DUF283 w rozpoznawaniu i wiązaniu określonej puli komórkowego RNA. Wskazano, że rejonem Dicer odpowiedzialnym za wiązanie G-kwadrupleksów RNA i DNA jest przypuszczalnie kasetta PPC (składającej się z domen Platformy i PAZ), a wiązanie G-kwadrupleksów nie wymaga dostępności końców 5' i 3' tych cząsteczek. Ponadto, zaproponowano model sekwestracji Dicer przez cząsteczki o strukturze G-kwadrupleksu.

Rozprawa doktorska jest bardzo dobrze zaprojektowana i składa się z następujących części: wykaz dorobku naukowego, streszczenia, abstraktu w języku angielskim, wykazu skrótów, wprowadzenia literaturowego, celu pracy, materiałów i metod, wyników, dyskusji, podsumowania, bibliografii, suplementu, i załączników. Załącznikami są dwie opublikowane prace badawcze, stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej, w których Pani mgr inż.

Agnieszka Szczepańska jest pierwszym autorem. Wszystkie wyniki są dobrze zaprezentowane i opisane.

Poniżej przedstawiam bardziej szczegółowe komentarze i pytania dotyczące rozprawy doktorskiej.

1. Oczyszczone białka Dicer mają sporo zanieczyszczeń. Część z nich została zidentyfikowana za pomocą spektrometrii masowej. Pomimo tego, że doktorantka opisuje je jako "niewielkie ilości", z przedstawionych żeli wydają się one znaczące. W związku z tym mam dwa pytania: i) czy w innych pracach badających oddziaływania białek z Dicer zidentyfikowano te białka? ii) czy istnieje możliwość, że te dodatkowe białka biorą udział w regulacji procesu enzymatycznego i tym samym wpływają na interpretację otrzymanych rezultatów?
2. Dlaczego oczyszczony Δ DUF(625-752) nie był w stanie przeciąć pre-miR-21, podczas gdy ten sam mutant w komórce był w stanie spowodować akumulację miR-21?
3. Kolejne pytanie dotyczy komórek produkujących zmutowane Dicer. Jakie jest porównanie poziomu pozostałych miRNA w porównaniu z komórkami produkującymi dziki Dicer? Czy planowane jest przeprowadzenie takiego eksperymentu w kontekście dalszych badań?
4. Rycina 12 przedstawia wizualizację etapu oczyszczania kompleksów Dicer/RNA z komórek. Dużo sygnału fluorescencji pochodzi od kompleksów, które z pewnością nie są Dicer, ponieważ migrują na wielu różnych pozycjach kDa. Ponadto, nie jestem przekonany czy zaznaczony obszar, z którego zostały wyizolowane kompleksy

RNA/białko, reprezentuje kompleksy Dicer/RNA. Aby zwiększyć pewność analiz, podobny eksperyment powinien zostać przeprowadzony w kontekście komórek HEK 293 NoDice. Dopiero wtedy można stwierdzić z większą pewnością, że analizowane kompleksy RNA/białko reprezentują prawdziwe kompleksy Dicer/RNA.

5. Wszystkie eksperymenty EMSA zostały przeprowadzone poprawnie. Niemniej jednak, brakuje kontrolnego EMSA z wykorzystaniem RNA, które nie wiązałyby się z Dicer. Dopiero wówczas można wnioskować, czy obserwowane wiązania z niekanonicznymi substratami są specyficzne.

Pomimo mojej krytyki, uważam, że przedstawiona rozprawa spełnia wszystkie ustawowe wymogi stawiane pracom doktorskim. Podsumowując, rozprawa doktorska mgr inż. Agnieszki Szczepańskiej jest interesującym i ważnym projektem badawczym. Pomimo znaczącego postępu w zrozumieniu procesu przetwarzania dwuniciowego RNA, wciąż nie do końca rozumiemy specyficzność głównych enzymów i mechanizmów tego procesu. Wyniki badań mgr inż. Agnieszki Szczepańskiej poszerzają naszą wiedzę na ten temat.

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 56/2023/Internet z dnia 29 marca 2023 r.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie mgr inż. Agnieszki Szczepańskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Z poważaniem,

prof. dr hab. Gracjan Patryk Michlewski

Michlewski

