



prof. dr hab. Mikołaj Olejniczak

Pracownia Biochemii RNA

27 maja 2023, Poznań

**Recenzja rozprawy doktorskiej**

**mgr inż. Agnieszki Szczepańskiej**

**zatytułowanej „Wybrane aspekty oddziaływań pomiędzy ludzką rybonukleazą  
Dicer i cząsteczkami kwasów nukleinowych”**

Praca doktorska Pani mgr inż. Agnieszki Szczepańskiej 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 ważną linią badawczą pracowni, która dotyczy poznawania właściwości poszczególnych domen enzymu Dicer, szczególnie w odniesieniu do rozpoznawania cząsteczek RNA.

Motywnym wiodącym w pracach badawczych, których wyniki składają się na rozprawę doktorską, było poznawanie roli jednej z domen białka Dicer, DUF283, w wiązaniu RNA oraz promowaniu oddziaływań pomiędzy cząsteczkami RNA. Badania te doprowadziły do odkrycia roli enzymu Dicer w wiązaniu struktur G-kwadrupleksów za pomocą regionu PPC sąsiadującego z domeną DUF283. Wyniki dotyczące funkcji domeny DUF283 oraz wyniki dotyczące wiązania G-kwadrupleksów stanowią dwie komplementarne części rozprawy.

W pierwszej części rozprawy Doktorantka porównała aktywność rybonukleolityczną oraz zdolność do promowania asocjacji komplementarnych RNA dla dwóch mutantów białka Dicer, z których jeden był pozbawiony samej domeny DUF283 (delecja 630-709), a drugi oprócz tej domeny był dodatkowo pozbawiony 5 aminokwasów po stronie N-końcowej delecji i 43 aminokwasów po stronie C-końcowej delecji (delecja 625-752). Substratem w badaniach aktywności RNazowej były cząsteczki RNA o różnej stabilności struktury drugorzędowej. O ile mutant pozbawiony zarówno domeny DUF283 jak i regionów sąsiadujących przecinał tylko cząsteczkę o najluźniejszej strukturze, to mutant pozbawiony wyłącznie domeny DUF283 przecinał wszystkie trzy substraty, w tym ten prawie w pełni dwuniciowy. Wyniki te sugerują, że



regiony sąsiadujące z DUF283 są niezbędne dla prawidłowej aktywności domeny helikazowej enzymu Dicer lub dla prawidłowej orientacji przestrzennej domen tego enzymu wobec miejsca przecinania substratu. Obniżoną aktywność obu mutantów delecyjnych enzymu Dicer sugerują ponadto przeprowadzone przez Doktorantkę w linii komórkowej HEK badania powstawania miRNA.

Obserwacja, że cząsteczki RNA o różnej strukturze są inaczej rozpoznawane przez oba warianty delecyjne enzymu Dicer może być bardzo pomocna dla zrozumienia funkcji regionu enzymu wokół domeny DUF2823. Natomiast w sytuacji gdy uzyskano dane dotyczące kinetyki (rysunek 9) warto byłoby je także zanalizować ilościowo. Na stronie 75 Doktorantka stwierdza, że mutant (630-709) przecinał badane RNA „z niewiele niższą wydajnością” niż Dicer pełnej długości, natomiast w dyskusji na stronie 114, że mutant ten przecinał badane RNA „co najmniej tak samo wydajnie” jak Dicer pełnej długości. Ponieważ są to przeciwstawne stwierdzenia, prosiłbym o wyjaśnienie podczas obrony. Warto też dodać, że ponieważ aktywność enzymu pełnej długości (Rysunek 9) była badana tylko w jednym punkcie czasowym nie jest możliwe porównanie kinetyki przecinania RNA przez oba enzymy, co utrudnia ich porównanie, szczególnie, że nie wiemy też na jakim poziomie dochodzi do wysycenia reakcji.

Drugą właściwością enzymu Dicer, którą Doktorantka postanowiła zanalizować w celu zrozumienia właściwości obu mutantów delecyjnych była ich zdolność do promowania asocjacji komplementarnych sekwencji RNA. Badania te wykazały, że oba białka pozbawione domeny DUF283 nie promowały powstawania duplesu złożonego z modelowych cząsteczek RNA zawierających komplementarne sekwencje. Natomiast taki duples powstawał w obecności enzymu Dicer pełnej długości. Co ciekawe, analiza żelu pokazującego powstawanie duplesu w obecności białka Dicer pełnej długości w rysunku 11B sugeruje, że w tym przypadku duples powstawał w pewnym stopniu także w reakcji kontrolnej bez enzymu. Czy jest możliwe, że reakcje te różniły się składem buforów, np. zawartością jonów magnezu, co mogłoby wpływać na wiązanie cząsteczek RNA? W tym zestawie eksperymentów brakuje mi dodatkowo reakcji kontrolnych zawierających enzym i tylko jedną z nici RNA, aby sprawdzić, czy w warunkach reakcji może także powstawać kompleks RNA-białko, a nie tylko kompleks RNA-RNA. Wyniki te sugerują, że domena DUF283 jest niezbędna dla udziału enzymu Dicer w promowaniu tworzenia duplesu RNA-RNA. Wnioski, które mogłyby wynikać z tej obserwacji nie są jednak poddane dyskusji za wyjątkiem dwóch zdań podsumowania na stronie 115. Czy



mógłbym poprosić Doktorantkę o przedyskutowanie podczas obrony jaki Jej zdaniem mógłby być mechanizm działania enzymu Dicer w promowaniu powstawania dupleksów RNA-RNA, a także jaka mogłaby być rola domeny DUF283 w tym procesie? Czy rolą białka Dicer mogłaby być rearanżacja struktury RNA, po to aby ułatwić oddziaływanie pomiędzy regionami o komplementarnych sekwencjach, czy raczej równoczesne wiązanie obu RNA przez Dicer, aby ułatwić ich oddziaływanie? Czy spodziewamy się bezpośredniej roli domeny DUF283 w promowaniu oddziaływań RNA-RNA, np. poprzez wiązanie tych RNA, czy też raczej roli pośredniej, np. poprzez zapewnienie odpowiedniej orientacji przestrzennej domen Dicer?

W drugiej części pracy Doktorantka podjęła się wysokoprzepustowej analizy oddziaływań mutantów delecyjnych enzymu Dicer z cząsteczkami RNA za pomocą metody irCLIP w komórkach linii HEK, oraz wykonała wstępną analizę różnic pomiędzy pulami RNA wiązanymi przez te białka. Wśród zidentyfikowanych RNA występowały m.in. cząsteczki zawierające długie sekwencje złożone z guanyn, które mogłyby przyjmować strukturę G-kwadrupeksów. W związku z tym Doktorantka postanowiła sprawdzić w jaki sposób enzym Dicer pełnej długości oraz jego fragment odpowiadający zawierający miejsce wiązania RNA (domena PPC) oddziałują z modelowymi strukturami G-kwadrupeksów pochodzącymi z telomerowego RNA człowieka oraz orzęsków. Wiązanie tych RNA porównała także z wiązaniem odpowiadających im sekwencji w wersji DNA. Badania te wykazały, że obie cząsteczki RNA wiązały się z domeną PPC znacznie silniej niż odpowiadające im cząsteczki DNA. Mniej przekonujące są wnioski dotyczące różnic pomiędzy wiązaniem cząsteczek o różnej długości, które są niewielkie, a na analizę tych wyników może wpływać heterogenność próbek. Ponadto w przypadku porównania cząsteczek DNA wartość błędu dla TEL22 jest większa niż średnie oszacowane wartości  $K_d$ . Ciekawą obserwacją jest to, że obie sekwencje RNA, ale szczególnie TER22, występowały w więcej niż jednej konformacji w formie wolnej, co sugeruje, że obserwowane wiązanie może być wypadkową różnych oddziaływań. Heterogenność formy wolnej oraz kompleksów pokazują także badania z sondą do detekcji struktur kwadrupeksów na rysunku 33. Czy mógłbym poprosić Doktorantkę o dyskusję podczas obrony znaczenia obserwowanej heterogenności konformacyjnej?

Dla lepszego scharakteryzowania oddziaływania badanych G-kwadrupeksów z domeną PPC, doktorantka porównała ich oddziaływanie także z mutantami tej domeny zawierającymi substytucje albo w części wiążącej region 5' albo w części wiążącej region



3' RNA. Eksperymenty wykonane w jednym stężeniu białka wykazały, że mutacje w obu tych regionach osłabiały wiązanie RNA. Doktorantka porównała także wiązanie do PPC cząsteczek RNA z wolnymi oraz połączonymi końcami, oraz sprawdziła, czy cząsteczki wiązane przez PPC oddziałują z barwnikiem specyficznym wobec struktur G-kwadrupleksów. Kontrolą, której mi zabrakło w tych badaniach było porównanie do cząsteczek RNA bogatych w guanozynę, której jednak nie tworzą struktur kwadrupleksów. Poprosiłbym Doktorantkę w czasie obrony o przedyskutowanie jakie mogłoby być znaczenie biologiczne obserwowanych oddziaływań pomiędzy domeną PPC a cząsteczkami G-kwadrupleksów?

Podsumowując, Doktorantka wykonała badania, które pozwoliły na poznanie nowych aspektów funkcji dwóch regionów enzymu Dicer, domeny DUF283 oraz domeny PPC, w kontekście ich oddziaływań z różnymi cząsteczkami RNA. Badania te dotyczyły zarówno takich cząsteczek RNA, które są substratami dla tego enzymu, jak i takich, których oddziaływanie z tym enzymem nie posiada jeszcze znanej funkcji. W badaniach tych zastosowała zarówno metody analizy oddziaływań pomiędzy oczyszczonymi cząsteczkami RNA i białek *in vitro* jak i metody detekcji oddziaływań oraz detekcji produktów reakcji zachodzących w modelowych komórkach. Świadczy to o zdobyciu przez nią umiejętności stosowania różnorodnych narzędzi badawczych, które mogą być przydatne w dalszej pracy naukowej.

Wyniki badań bezpośrednio związanych z rozprawą doktorską zostały opublikowane w dwóch pracach, z których w jednej Doktorantka jest jedną z dwóch pierwszych autorek (*Cellular and Molecular Life Sciences*), a w jednej jest pierwszą autorką (*International Journal of Molecular Sciences*). Obie te prace są załączone do rozprawy. Doktorantka jest także współautorką trzech innych publikacji dotyczących enzymu Dicer.

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. inż. Agnieszki Szczepańskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

*M. Olejniczak*

Mikołaj Olejniczak