

Prof. Jarosław Poznański  
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN  
ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa

Warszawa, 13-IX-2017

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Mai Cieplak-Rotowskiej pt.**

***„Biophysical and molecular biology studies of proteins involved in gene silencing”***

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Mai Cieplak-Rotowskiej powstała w Zakładzie Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego pod opieką dr hab. Anny Niedźwieckiej. Należy zaznaczyć, że promotor jest uznaną specjalistką w badaniach nad organizacją kompleksów translacyjnych, posiadającą w tej dziedzinie znaczący i udokumentowany dorobek naukowy. Można więc domniemywać, że przedłożona rozprawa jest fragmentem szerszego planu badawczego realizowanego w Zakładzie Biofizyki IFD UW.

Mechanizm wyciszania genów jest jednym z kluczowych zagadnień współczesnej biologii molekularnej. Proces ten, obok aktywacji/represji transkrypcji oraz skomplikowanej sieci modyfikacji potranslacyjnych, stanowi jeden z trzech poziomów regulacji szlaków prowadzących do syntezy białek w ilości optymalnej dla utrzymania homeostazy. Za zjawisko interferencji RNA, prowadzące do wyciszania genów, odpowiadają cząsteczki RNA, występujące zarówno w postaci dwuniciowego siRNA o sekwencji zgodnej z sekwencją docelowego genu, jak i jednoniciowego miRNA, które (w odróżnieniu od siRNA) nie musi być w 100% zgodne z sekwencją docelowego genu. Interferencja RNA, badania nad którą uhonorowano w 2006 roku Nagrodą Nobla, znalazła liczne praktyczne zastosowania, gdyż dzięki niej można specyficznie, a zarazem odwracalnie, ograniczyć aktywność konkretnych genów. Należy sądzić, że wkrótce cząsteczki siRNA znajdą szersze zastosowanie w tzw. terapiach celowanych, pozwalając np. na ograniczenie ekspresji patologicznych form białek związanych z transformacją nowotworową.

Cząsteczka siRNA/miRNA oddziałująca z mRNA jest rozpoznawana przez odpowiedni kompleks białkowy, a późniejsza seria zdarzeń zależy już od specyficznych oddziaływań w obrębie takiego kompleksu. Analizy genomu człowieka sugerują, że blisko

1/3 genów może być regulowana za pomocą miRNA. Metodami biochemicznymi zostały zidentyfikowane składniki kompleksu CCR4-NOT odpowiedzialnego za proces miRNA-zależnej deadenylacji mRNA, prowadzący do jego przyspieszonej degradacji, a więc w konsekwencji do efektywnego zmniejszenia poziomu ekspresji kodowanego przez to mRNA białka. W skład tego kompleksu wchodzi między innymi białko GW182 oraz CNOT1, których oddziaływanie było właściwym przedmiotem badań Doktorantki. Opisanie sposobu oddziaływania tych białek jest niezwykle istotne, gdyż wiele dowodów wskazuje, że białko GW182 może być także zaangażowane w proces hamowania translacji, aczkolwiek doniesienia literaturowe wskazują, że mechanizm zależnej od miRNA deadenylacji mRNA dominuje.

### **Formalna ocena rozprawy**

Rozprawa została napisana w języku angielskim. Liczy ponad 180 stron, a uzupełniona jest 273 odnośnikami literaturowymi oraz 30-o stronicowym dodatkiem zawierającym głównie szczegółowe informacje pominięte w głównym tekście. W skład rozprawy wchodzi kolejno streszczenia w języku polskim i angielskim, spis treści, wykaz stosowanych skrótów, 27-o stronicowy wstęp stanowiący wprowadzenie w tematykę badań, cele pracy, opis użytych materiałów i stosowanych metod, stustronicowy opis uzyskanych wyników oraz krótkie podsumowanie. Brak jest wyodrębnionej dyskusji, która została, w moim odczuciu niefortunnie, rozbita na części włączone do każdego z dziewięciu podrozdziałów opisujących wyniki cząstkowe, z reguły jako krótkie podsumowania.

Część opisanych wyników została już opublikowana w wysoko cytowanym artykule w *Nature Structural & Molecular Biology* (DOI: 10.1038/nsmb.2149), w którym Doktorantka jest drugim autorem, a swój wkład w przedstawione tam badania jednoznacznie określiła w rozprawie. Z kolei wstępne wyniki pomiarów stabilności domeny SD białka GW182 (a dokładniej konstruktu SD10) oraz centralnej domeny podjednostki CNOT1 (aa. 800-999) z kompleksu CCR4-NOT, a także wpływ oddziaływania krótkich fragmentów białka GW182 na zmiany w stabilności różnych regionów badanej domeny podjednostki CNOT1 zostały zaprezentowane w 2015 roku na 40 Kongresie FEBS w Berlinie (WOS: 000362570606066). Większość odnośników literaturowych w pracy liczy mniej niż 10 lat, nieco dziwi jednak niewielki udział najnowszych publikacji (o ile się

nie pomyliłem, to dokładnie 50 prac, a więc niecałe 20%, powstało po 2012 roku,), podczas gdy tylko na temat kompleksu CCR4-NOT ukazuje się blisko 50 publikacji rocznie, wśród których średnio 10 bezpośrednio dotyczy organizacji podjednostek w jego obrębie.

Sama praca została w moim odczuciu zredagowana niezbyt starannie, a Doktorantka nie ustrzegła licznych błędów. Za takie uważam między innymi używanie sformułowania „*amino acid*” dla określenia pozycji w obrębie białka. W języku angielskim określenie to stosowane jest raczej w odniesieniu do grupy związków niskocząsteczkowych zawierających jednocześnie grupę aminową i karboksylową, a więc między innymi dla aminokwasów budujących białka. Jednak w przypadku samych białek używana jest forma „*residue*” lub ew. „*amino-acid residue*”, jak np. w zwrocie „*N-terminal residue*”. Doktorantka konsekwentnie stosowała tę formę jedynie w obrębie listy skrótów, ale już na stronie 21 dziesięciokrotnie użyła zwrotu „*amino acid(s)*”, a jedynie raz prawidłowego wyrażenia „*residue*”. W tekście rażą także żargonowe zwroty, jak na przykład „*reaction was acidified*” (str. 71), zamiast „*reaction mixture was acidified*”.

Sam wstęp literaturowy został opracowany wystarczająco, szczególnie w części przedstawiającej biologiczny kontekst prowadzonych badań. Aczkolwiek i tu autorka nie ustrzegła się niefortunnych sformułowań. Dla przykładu, kontrowersyjne są już trzy pierwsze zdania rozprawy. "*In every living organism genetic information about how it looks and works is stored in deoxyribonucleic acid (DNA). In eukaryotes DNA is stored in the cell nucleus. Here, in a process called transcription, DNA can be rewritten into a molecule called messenger ribonucleic acid (mRNA)*". W pierwszym z tych zdań Doktorantka odnosi się, w świetle przedmiotu Rozprawy chyba niepotrzebnie, do podstawowego problemu definicji życia, całkowicie przy tym pomijając istnienie RNA-wirusów. Z kolei w drugim została przeoczona obecność makronukleusa u orzęsków, a co ważniejsze także występujących w większości komórek eukariotycznych mitochondriów wraz z ich pozajądrowym mtDNA. Zaś w kolejnym zdaniu Doktoranta nieświadomie zanegowała podstawy genetyki molekularnej - w rzeczywistości w większości przypadków transkrypcji poddawane są jedynie niewielkie fragmenty DNA (geny), które zwykle kodują sekwencje pojedynczych białek. W kolejnym akapicie Doktorantka nieco trywializuje rolę modyfikacji potranslacyjnych pisząc „... *and ending on post-translational modification – where a protein can either be marked for fast degradation or just switched into an inactive state*”, podczas gdy w rzeczywistości w komórce istnieją całe kaskady procesów modyfikacji (np.

fosforylacja), biorących udział w przekazywaniu sygnałów w komórce. Modyfikacje potranslacyjne mogą nie tylko aktywować/dezaktywować białka, ale także wpływać na ich oddziaływanie ze specyficznymi partnerami molekularnymi (np. nitrozyłacja czy pewnie bliższa zainteresowaniom Doktorantki acetyłacja histonów) lub nawet zmieniać lokalizację komórkową białka (np. kotwice prenyłowe czy glikolipidowe).

W krótkim rozdziale 1.2.1 „*The effect of deuteration on hydrogen bonds and protein structure*” także znalazło się kilka nieprecyzyjnych sformułowań. Moim zdaniem wcześniej powinny znaleźć się bardziej ogólne informacje, z których część jest zawarta w rozdziale 1.3.1. Przede wszystkim pojęcie deuteracji białek ma dwojakie znaczenie. W przypadku tzw. protonów wymienialnych, czyli w uproszczeniu tych związanych z heteroatomami, po umieszczeniu białka w roztworze „ciężkiej wody”, tzn.  $^2\text{H}_2\text{O}$ , po pewnym czasie następuje osiągnięcie równowagi między obsadzeniem izotopami  $^1\text{H}$  oraz  $^2\text{H}$ . Z kolei atomy wodoru przyłączone do atomów węgla są praktycznie inertne i nie podlegają procesowi wymiany, chociaż poprzez ekspresję białka w  $^2\text{H}_2\text{O}$ , bądź w obecności deuterowanych prekursorów można uzyskać jednorodne lub nawet specyficzne podstawienie izotopem  $^2\text{H}$  protonów „niewymienialnych” (a ściślej atomów  $^1\text{H}$ ). Procedura taka jest często stosowana w przypadku pomiarów dużych białek za pomocą NMR. Tego rozróżnienia Doktorantka nie uczyniła, aczkolwiek niewątpliwie jedynie pierwszy z wymienionych procesów był przez nią badany. Także zdanie „*The exchange of hydrogen to deuterium can occur for those hydrogens that are not engaged in hydrogen bonding, while the stable hydrogen bonds protect hydrogen from the exchange*” nie jest ścisłe. Oczywiście jest, że atomy wodoru (protony) zaangażowane w wiązania wodorowe z rozpuszczalnikiem podlegają szybkiej wymianie. Z drugiej strony, występują wiązania wodorowe, w których proton w nie ulega procesowi wymiany – np. powszechnie obserwowane w układach białkowych wiązanie typu  $\text{CH}\dots\text{O}$  (DOI: 10.1074/jbc.R112.418574).

W rozdziale 1.3.1 znalazło się kolejne nieprecyzyjne zdanie „*Protein hydrogens that are solvent exposed or are highly dynamic will quickly exchange to deuterium, while those that are buried inside of the protein, are less dynamic or are involved in hydrogen bonding, are protected from the exchange, and will either exchange slower or not at all during the time course of the experiment.*”, które oczywiście dotyczy jedynie „**exchangable hydrogens**”, a tworzenie wiązań wodorowych z rozpuszczalnikiem wcale nie powoduje

zmniejszenia szybkości wymiany. Opis różnych typów kinetycznych procesu wymiany protonów okazuje się także nie do końca precyzyjny; zdanie „*Hydrogens present in side chains exchange very quickly, but during the HDX-MS experiment exchange back to hydrogen and are not detected by the mass spectrometer*” nie jest całkowicie oczywiste - w przypadku protonów grup amidowych Asn i Gln szybkość wymiany może być porównywalna z wartościami obserwowanymi dla protonów amidowych łańcucha głównego (DOI: 10.1023/A:1008296932751).

W rozdziale zatytułowanym „*Ability of different CNOT1 mutants to bind SD10*” wbrew tytułowi znajdują się dane dotyczące nie tylko SD10, ale także całej domeny SD białka GW182 (SDF).

Wiele nieścisłości znalazło się w rozdziale „*Physical bases of noncovalent bonds responsible for structures and interactions of biomolecules*”. Przy opisie różnych typów oddziaływań zostały całkowicie pominięte efekty steryczne, których wkład w przypadku zbyt bliskich kontaktów międzycząsteczkowych dominuje (np. czynnik  $r^{-12}$  w potencjale L-J). A przecież efekt dopasowania przestrzennego oddziałujących (makro)cząsteczek został już w XIX wieku opisany przez E. Fishera (*lock and key theory*), a samo zjawisko jest bezpośrednią konsekwencją zakazu Pauliego zastosowanego do nakrywających się orbitali atomowych/molekularnych (oczywiście w zakresie niskich energii odpowiadających oddziaływaniom makrocząsteczek). Z kolei w przypadku wiązania wodorowego nie można mówić wyłącznie o wkładzie elektrostatycznym, skoro już w 1999 roku w grupie Adriana Baxa wykazano obecność sprzężeń skalarnych poprzez wiązanie wodorowe, analogicznych do występujących w przypadku wiązań chemicznych (DOI: 10.1021/ja9902221). W tym samym roku została także zaprezentowana spójna teoria oddziaływań hydrofobowych, obowiązująca zarówno w skali nano-, jak i mikrometrów (DOI: 10.1021/jp984327m), której istnienie zostało przez Doktorantkę pominięte. W szczególności, w zależności od skali, wkład oddziaływań hydrofobowych zależy albo od powierzchni kontaktu rozpuszczalnikiem (a więc powierzchni wnęki), albo od objętości cząsteczki (objętość wnęki, dominuje w skali nano). Z mniejszych nieścisłości, w Tabeli 1 przy opisie oddziaływania jon-dipol błędnie wstawiono czynnik  $f(\theta)$ , a w jej ostatnim wierszu znajduje się tajemnicze sformułowanie „*Hydration force*”, którego nigdzie więcej w rozprawie nie znalazłem, a które raczej dotyczy wykładniczo zanikających z odległością oddziaływań występujących między obiektami o relatywnie

dużych powierzchniach, np. błony, filmy czy granice faz. W ramach komentarza chciałbym dodać jeszcze, że pierwsze pięć wierszy z Tabeli 1 formalnie odpowiada pierwszym wyrazom rozwinięcia multipolowego potencjału oddziaływań elektrostatycznych, które to rozwinięcie ma zastosowanie jedynie w przypadku, gdy rozmiary oddziałujących obiektów są niewielkie w porównaniu z odległością między nimi. Tak więc, ryzykowny jest zaprezentowany przez Doktorantkę opis oddziaływań warstwowych, gdyż wkład wzajemnej orientacji pierścieni będzie zwykle dominował, a jest on bardzo skomplikowany funkcjonalnie - w ogólnym przypadku 5 stopni swobody, w tym 4 kątowe.

### **Tematyka badań oraz sposób realizacji zadeklarowanych w rozprawie celów**

Ogólnym celem ocenianej rozprawy było określenie roli białka TNRC6C (GW182) w procesie zależnego od miRNA wyciszania ekspresji genów, następującego w wyniku prowadzonej przez kompleks CCR4-NOT deadenylacji mRNA.

Szczegółowe cele postawione przez Doktorantkę to:

1. Opis dynamiki strukturalnej całej domeny wyciszającej białka GW182 (aa. 1260-1620) oraz fragmentu białka CNOT1 (aa. 800-999), który odpowiada za oddziaływanie z nią w kompleksie CCR4-NOT
2. Identyfikacja regionów białka GW182 odpowiedzialnych za oddziaływanie z kompleksem CCR4-NOT
3. Szczegółowy opis tych oddziaływań
4. Identyfikacja regionów podjednostki CNOT1 z kompleksu CCR4-NOT odpowiedzialnych za oddziaływanie z badaną domeną białka GW182.
5. Opis oddziaływań zachodzących między domeną wyciszającą GW182, podjednostką CNOT1 oraz Tristetraproliną (TTP), która oddziałując z 3'-UTR jest kolejnym czynnikiem wpływającym na poziom translacji.

W swojej pracy Doktorantka posługiwała się głównie metodami biologii molekularnej i biochemii (ta część badań została zrealizowana najprawdopodobniej głównie w ramach stażu naukowego na Uniwersytecie McGill w Montrealu), uzupełnionymi badaniami biofizycznymi opartymi w większości o pomiary kinetyki wymiany proton-deuter przy użyciu spektrometrii mas (współpraca z grupą prof. Michała

Dadleza z IBB PAN). Pozwoliło to łącznie na w miarę precyzyjną analizę fragmentu sieci oddziaływań występujących w obrębie kompleksu CCR4-NOT. Badania uzupełniają modele wygenerowane *in silico* na podstawie struktur dostępnych dla zbliżonych układów. Ze względu na zakres stosowanych metod, badania prowadzone przed Doktorantką można uznać za interdyscyplinarne.

Ze względu na koncepcję badań w pracy można wyróżnić dwa wątki. Pierwszy stanowi przeprowadzona metodami biochemicznymi identyfikacja podjednostki CNOT1 jako partnera białka GW182 w kompleksie CCR4-NOT oraz późniejsze wskazanie w sekwencji białka GW182 motywów CIM1 oraz CIM2, odpowiedzialnych za to oddziaływanie. Co ciekawe, obecność tych motywów w różny sposób wpływa na proces prowadzonej przez kompleks CCR4-NOT deadenylacji mRNA. Ta część badań, opublikowana w 2011r w *Nat. Struct. Mol. Biol.* (DOI: 10.1038/nsmb.2149), została bardzo dobrze opisana, a na ich podstawie wybrano modelowe obiekty, których właściwości zostały później przeanalizowane metodami biofizycznymi. Z obowiązku recenzenta muszę jednak wskazać na pewną niekonsekwencję Doktorantki. Mianowicie, przedstawione wyniki znajdują jedynie fragmentaryczne odniesienie na liście szczegółowych celów, i to jedynie z punktem 2 (*identify GW182 silencing domain regions responsible for interacting with the CCR4-NOT Complex*), który najprawdopodobniej miał jednak dotyczyć procesu wymiany proton-deuter. Dalsza część badań, związana głównie z analizami strukturalnymi, została już zaprezentowana zgodnie z kolejnością założonych celów. Na wyróżnienie zasługuje wybór metody spektrometrii mas, która od kilku lat znajduje coraz większe zastosowanie w badaniach zarówno struktury białek, jak i wpływu oddziaływań molekularnych na jej stabilność. W ten sposób spektrometria mas stała się niskorozdzielczym uzupełnieniem standardowych technik strukturalnych (krystalografia, NMR), a w przypadku obiektów zbyt dużych (NMR) lub zbyt nieuporządkowanych (krystalografia) zaczyna być, obok SAXS, metodą pierwszego wyboru. Chciałbym w tym miejscu zaznaczyć, że w odróżnieniu od dwóch wspomnianych metod strukturalnych nie ma zoptymalizowanych protokołów naboru danych czy analizy wyników HDX-MS, a więc każdy nowy eksperyment może stanowić wielkie wyzwanie. W tym konkretnym przypadku nie mam żadnych zastrzeżeń dotyczących sposobu przeprowadzenia pomiarów czy wyboru odpowiednich procedur kontrolnych. Chciałbym jednak zwrócić uwagę na sposób oszacowania masy białka na podstawie widm MS. Otóż wszystkie badane próbki białka były na tyle homogenne, że nie ma najmniejszych problemów z

identyfikacją sygnałów odpowiadających kolejnym stopniom jego protonacji. Dla przykładu, identyfikacja sygnałów obwiedni M/z dla konstruktu SD10 jest ewidentna (Fig 45, str. 102). Dlaczego więc posłużono się iteracyjną procedurą dekonwolucji operującą na **całym** widmie masowym ( $M=39822 \pm 5$  Da), skoro możliwa jest bezpośrednia analiza położenia sygnałów na fragmencie widma MS, która zajmuje jedynie kilka minut, prowadząc do oszacowania masy na  $39819.7 \pm 0.6$  Da, przy czym sygnał przy M/z równym 752.2798 Da odpowiada wartości  $z=53$ . Masa białka wyznaczona jest w ten sposób znacznie dokładniej, a równocześnie okazuje się bliższa wartości wyliczonej na podstawie sekwencji (39819.9).

Pierwszym z analizowanych obiektów, jednocześnie przebadanym najdokładniej, jest konstrukt SD10 niosący fragment domeny wyciszającej SD białka GW182 (1260-1620). W celu optymalizacji procedury produkcji białka Doktorantka przetestowała szereg protokołów ekspresji, uzyskując w ten sposób znaczący wzrost wydajności, a sekwencja końcowych produktów była zawsze potwierdzona metodą MS-MS. Dla konstruktów SD10 (1260-1620) oraz SDfl (1260-1690) końcowa wydajność była zbliżona, podczas gdy SD1 (1382-1690) uzyskano już w znacznie mniejszej ilości. W tym miejscu nasuwa się pytanie, dlaczego Doktorantka nie podjęła próby zbadania za pomocą spektrometrii mas także pełnej domeny SDfl (1260-1690).

Ponieważ analiza bioinformatyczna wskazała, że GW182 należy do klasy białek natywnie nieustrukturyzowanych (poza 100 aa. obszarem RRM), Doktorantka przeprowadziła serię pomiarów fluorescencji, mających na celu oszacowanie średniego stopnia nieuporządkowania struktury. Nie polemizuję ze stwierdzeniem, że pierścienie indolowe tryptofanu w SD10 znajdują się w bardziej polarnym środowisku niż w przypadku referencyjnego białka eIF4E, ale muszę zwrócić uwagę, że różnica w wartości F350/F330 zaobserwowana przez Doktorantkę w 60<sup>o</sup> ( $\sim 0.25$ ), gdy oba białka są w formie rozwiniętej, jest znacznie większa niż zmiana wywołana denaturacją termiczną białka eIF4E ( $\sim 0.10$ , Fig. 49). Można więc wnioskować, że w analizowanym przypadku lokalny wpływ sekwencji aminokwasowej przewyższa efekt zmiany otoczenia pierścieni indolowych spowodowany procesem denaturacji białka. Tak więc wniosek, *„Thus, the eleven tryptophans in SD10 are, by average, in a much more polar environment than the eight tryptophans of the globular eIF4E protein, indicating they are much more water expose and present in a mainly disordered protein environment”* w swej drugiej części

wydaje się nieuprawniony. A przy okazji, stosowany w tym rozdziale dwukrotnie skrót NATA (N-Acetyl-L-tryptophanamide) nigdzie w rozprawie nie został rozwinięty.

Niezwykle starannie przeprowadzona analiza wyników doświadczeń HDX-MS wykazała, że rzeczywiście jedynie w obszarze RRM występuje wyraźna protekcja grup amidowych, co dowodzi, że w warunkach roztworu jedynie domena RRM białka GW182 przyjmuje stabilną formę, zgodną ze strukturą wyznaczoną metodą NMR dla homologu z *Drosophila melanogaster*. Niezwykle istotne jest, że Doktorantka niezależnie oszacowała wkłady pochodzące od grup amidowych wymieniających się szybko oraz wolno. Pozwoliło to na zgrubne oszacowanie ilości wiązań wodorowych formowanych w obrębie struktury białka przez każdy z peptydów litycznych, a więc na ilościową weryfikację zaproponowanego modelu przestrzennego. Tak na przykład, dla fragmentu 1531-1543, pokrywającego  $\alpha 1$ /turn/ $\beta 2$ , zaobserwowano protekcję dla niemal 77% protonów, co wydaje się zgodnie z modelem, w którym w obszarze 13 aminokwasów (1531-1543) można oczekiwać 8 wiązań wodorowych (6 w obszarze helisy  $\alpha 1$  i jedynie 2 w obszarze  $\beta 2$ ), co odpowiadałoby współczynnikowi protekcji 75%. Z kolei dla obszaru 1544-1552 model przewiduje 4 stabilne wiązania wodorowe, co stanowi 50% wszystkich grup amidowych, podczas gdy w roztworze jedynie niecałe 20% z nich ulega protekcji. Już na przedstawionym przykładzie widać, jak ostrożnie należy podchodzić do analizy danych HDX-MS.

Dodatkowo przedstawiona jest analiza bimodalnych zmian obwiedni obserwowanych dla peptydu 1581-1592. Co prawda była ona przeprowadzona przez inną osobę, ale skoro została umieszczona w rozprawie, to pozwalam sobie ją skomentować. Po pierwsze dziwi mnie, że udziały wymiany szybkiej i wolnej nie zawsze sumują się do 100%. Po drugie zastanawia mnie, na jakiej podstawie przyjęto, że przejście od stanu „closed” do „open” jest nieodwracalne. Przecież na podstawie pomiarów HDX-MS nie można wnioskować, że udział formy „closed” maleje z czasem: *„The open conformation seemingly increases in population over time”*. Specyfika pomiaru HDX-MS pozwala jedynie na rozróżnienie form „**never open**” i „**open at least once**”. Oczywiście udział pierwszej z tych form monotonicznie maleje z czasem, ale nie implikuje to globalnego zaniku formy „closed”, która może przez cały czas znajdować się w równowadze z formą „open”. To, czy przejście między stanem „closed” a „open” jest odwracalne, trzeba sprawdzić doświadczalnie, np. poprzez godziną inkubację w H<sub>2</sub>O poprzedzającą dodanie do próbki

$^2\text{H}_2\text{O}$ . Jeśli wystąpią różnice, to będzie oznaczać, że próbka GW182 jest niestabilna, a wtedy należałoby bardzo starannie zweryfikować wszystkie wyniki, także te wcześniej uzyskane. Sama interpretacja efektu zamrażania-rozmrażania też nie jest dla mnie oczywista. Czy początkowy stosunek 40:60 oznacza, że 40% populacji białka jest takie samo jak bez cykli zamrażania-rozmrażania, czy raczej obserwujemy (nie)równowagę między dwoma zupełnie innymi stanami? W pracy nie znalazłem informacji o tym, czy proces zamrażania/rozmrażania wpływa na strukturę pozostałych obszarów białka. Jeśli obserwowane zmiany, w tym podwójna obwiednia, dotyczą jedynie próbki poddanej cyklowi zamrażania/rozmrażania, to miejsce takiej analizy widziałbym raczej w dodatku do pracy, gdyż informacje te nie mają żadnego związku z jej głównym wątkiem.

W kolejnym etapie badań za pomocą metody HDX-MS została określona stabilność strukturalna fragmentu podjednostki CNOT1 (800-999). Pomiary te były niezbędne, jako że stanowiły odniesienie do planowanego mapowania na strukturze białka zmian powodowanych przez oddziaływanie CNOT1 z potencjalnymi partnerami modularnymi. Oszacowany rozkład szybkości wymiany H/D w obrębie sekwencji białka był w bardzo dobrej zgodności z jego znaną strukturą. Proces wymiany okazał się generalnie znacznie wolniejszy niż dla GW182, co nie powinno dziwić, gdyż zwykle duże helikalne domeny są bardziej stabilne niż pojedyncze  $\beta$ -kartki. Oba efekty zostały przez Doktorantkę we właściwy sposób zinterpretowane.

Otrzymane powyżej dane posłużyły jako odniesienie przy mapowaniu miejsc oddziaływania kilku znanych ligandów (fragment białka TTP oraz motywy CIM1, dCIM1 (przedłużony CIM1) i CIM2 z GW182) podjednostki CNOT1 (800-999). Cała procedura została przeprowadzona niezwykle starannie, dziwi mnie tylko potraktowanie fragmentu CIM2 jako kontroli negatywnej „*This peptide, derived from GW182, contains the CCR4-NOT interacting motif 2 that is known not to interact with CNOT1, but with CNOT9*” (str. 125), skoro sama Doktorantka sprawdziła, że obecność motywu CIM2 wpływa na oddziaływanie SD GW182 z CNOT1 (Fig. 30, str. 85), co jest także zgodne z mechanizmem prezentowanym w oryginalnej pracy z *Nature Structural & Molecular Biology*. Z kolei w publikacji, na którą powołała się Doktorantka (34), znajduje się stwierdzenie "*Interaction of the latter region (CNOT1 830-1,001) with the TNRC6C SD (GW182) is direct and depends on the integrity of CIM-1 and CIM-2 elements (M. Fabian and N. Sonenberg, personal communication)*". Jednak w świetle uzyskanych przez Doktorantkę wyników motyw CIM2

faktycznie nie wpływa na stabilność struktury badanego fragmentu podjednostki CNOT1, co w pewnym stopniu potwierdza hipotezę postawioną w pracy (34), że CIM2 oddziałuje z C-kończącym obszarem CNOT1, leżącym poza badanym fragmentem (800-999). Podobieństwo zmian w stabilności fragmentu podjednostki CNOT1 spowodowanych utworzeniem kompleksów pozwoliło wnioskować, że sposób wiązania motywów CIM1 i dCIM1, a także całego konstruktu SD10, jest zbliżony do tego, w jaki TTP wiąże się do CNOT1. Ale skoro dodanie fragmentu DPSQS przed sekwencją CIM1 (dCIM1) spowodowało wyraźne wzmocnienie oddziaływania z CNOT1, to motyw CIM1 został najprawdopodobniej wcześniej zdefiniowany zbyt rygorystycznie (także w publikacji), a jego sekwencja być może powinna zostać zredefiniowana. Z kolei brak efektu oddziaływania motywu CIM1 z CNOT1 niosącym dwie zmiany aminokwasowe (E893A i Y900A) dodatkowo potwierdził poprawność zaproponowanego modelu. Seria bardzo szczegółowych analiz kinetyki wymiany proton/deuter przeprowadzona dla dużej grupy peptydów pozwoliła Doktorantce uzyskać informacje o oddziaływaniach niemal na poziomie pojedynczych aminokwasów. O ile jednak analiza wymiany dla poszczególnych peptydów, w tym także różnic spowodowanych tworzeniem kompleksów, jest całkowicie uprawniona, to osobiście podchodziłbym do tak szczegółowych analiz bardzo sceptycznie. Moim zdaniem porównywanie ze sobą poziomu wymiany dla różnych peptydów może być obarczone znacznym ryzykiem. W szczególności nieuprawnione wydaje się przypisanie przez Doktorantkę różnicy w poziomie wymiany H/D dla peptydów 839-846 oraz 839-847 jedynie wymianie protonu amidowego Phe847, gdyż takie wnioskowanie implikuje nieweryfikowalne, a i z dużą dozą prawdopodobieństwa nieprawdziwe, założenie o jednorodnym rozkładzie wtórnej wymiany proton/deuter (*back exchange*).

Powinowactwo GW186 (a dokładniej SD10) oraz tristetraproliny (TTP) do fragmentu CNOT1 zostało wstępnie oszacowane za pomocą metody immunoprecypitacji na odpowiednio 300 i 820 mM<sup>-1</sup>, a kolejne eksperymenty wykazały, że oba białka rzeczywiście rywalizują o to samo miejsce wiązania. Dodatkowe testy potwierdziły, że wprowadzone do CNOT1 zmiany w pozycjach P857 T858 E893 i Y900 w istotny sposób zmniejszają powinowactwo fragmentu podjednostki CNOT1 zarówno do SD10, jak i SD pełnej długości (SDfl).

Powinowactwo dCIM1 do CNOT1 (800-999) zostało także oszacowane za pomocą metody HDX-MS. Na podstawie analizy wpływu stężenia liganda na wielkość wymiany

proton/deuter obserwowanej po 2h inkubacji w  $^2\text{H}_2\text{O}$ , dla każdego z peptydów litycznych oszacowano niezależnie wartość efektywnej stałej asocjacji, która zmieniała się w zakresie  $10^3$ - $10^5\text{M}^{-1}$ . W tym miejscu nasuwa się pytanie, dlaczego Doktorantka nie podjęła próby dopasowania jednej globalnej wartości  $K_{as}$ , lub ewentualnie dwóch wartości odpowiadających postulowanym przez Nią sposobom wiązania peptydu dCIM1. W moim odczuciu obserwowane różnice w wartości indywidualnych stałych asocjacji mogą być artefaktem obliczeniowym. Dopiero globalna analiza pozwoliłaby na wiarygodne oszacowanie wartości stałej wiązania, a także na przetestowanie, czy występują dwie, czy też tylko jedna wartość  $K_{as}$ . Trudno mi się także zgodzić z interpretacją Doktorantki, że dwie wartości  $K_{dis}$  ( $42 \pm 9 \text{ mM}^{-1}$  i  $90 \pm 12 \text{ mM}^{-1}$ ) odpowiadają wiązaniu różnych fragmentów tej samej cząsteczki, gdyż w takim przypadku związanie drugiego fragmentu jest reakcją zerowego rzędu i nie powinno się oczekiwać żadnej zależności od stężenia. Za obserwowany efekt mogłyby odpowiadać alternatywne mechanizmy wiązania peptydu. Należałoby także rozważyć możliwość wystąpienia efektu pośredniego, odpowiadającego „allosterycznej regulacji” czy też propagacji efektu stabilizacji struktury pod wpływem związania liganda na odległe rejony białka, a nie przypisywać wszystkich obserwowanych różnic bezpośredniemu oddziaływaniu między białkiem a ligandem.

Uzyskane wyniki pozwoliły Doktorantce na zbudowanie modelu struktury kompleksów fragmentu podjednostki CNOT1 z (d)CIM1 oraz na ich porównanie z dostępną w bazie PDB strukturą kompleksu fragmentu CNOT1 z peptydem z TTP. Analizując podobieństwo strukturalne badanych kompleksów Doktorantka zaproponowała nową sekwencję SLiM (RLXXΦ), związaną z oddziaływaniem między różnymi podjednostkami kompleksu CCR4-NOT. Zdefiniowanie takiego motywu należy uznać za znaczące osiągnięcie, gdyż pozwala to wnioskować o subtelnych mechanizmach regulacji występujących w obrębie kompleksu CCR4-NOT, a więc dostarcza nowych informacji o zależnym od miRNA mechanizmie regulacji transkrypcji. Brakuje mi jednak dogłębniejszej analizy proponowanych struktur pod kątem oddziaływań molekularnych faworyzujących te trzy aminokwasy.

## **Podsumowanie**

Rezultaty przedstawione w ocenianej rozprawie zostały uzyskane w wyniku starannej analizy danych doświadczalnych. Mimo pewnych zastrzeżeń dotyczących

niektórych ze zastosowanych metod, końcowe wnioski należy uznać za w pełni uzasadnione. Oceniana rozprawa w sposób istotny powiększyła wiedzę o wzajemnym oddziaływaniu podjednostek z kompleksu CCR4-NOT, a więc o molekularnym mechanizmie procesu wyciszania genów przez miRNA. Jednak w moim odczuciu Doktorantka nie wykorzystała w pełni potencjału badawczego, jakim dysponowała. W szczególności, nie przeprowadziła komplementarnych eksperymentów umożliwiających analizę wpływu podjednostki CNOT1 na strukturę domeny SD, co pozwoliłoby jednoznacznie zidentyfikować regiony białka GW182 rzeczywiście zaangażowane w oddziaływanie z CNOT1 (800-999). W moim odczuciu praca została zredagowana niestarannie, o czym najlepiej świadczą liczne, mam nadzieje że niezamierzone, nieścisłości. W szczególności za niewystarczającą uważam charakterystykę niewiążących oddziaływań międzycząsteczkowych, zwłaszcza ze strony Doktorantki Wydziału Fizyki UW. Razi także niemal całkowity brak dyskusji otrzymanych wyników w kontekście aktualnego stanu wiedzy o organizacji kompleksu CCR4-NOT. W moim odczuciu Doktorantka mogłaby na podstawie przedstawionych w Rozprawie wyników zmodyfikować schematy oddziaływań przedstawionych na Fig. 15 czy Fig. 29. Z drugiej strony, część analiz nie dotyczących głównego wątku pracy (np. wpływ cykli zamrażania/rozmarzania na strukturę domeny RMM) powinny znaleźć się raczej w suplemencie, co wyraźnie wpłynęłoby na spójność narracji. Niezależnie od przedstawionych uwag, ocenianą rozprawę uważam za pracę wartościową, która w moim odczuciu spełnia wymagania zarówno zwyczajowe jak i formalne, określone w Ustawie z dnia 18 marca 2011 o stopniach naukowych i tytule naukowym dla stopnia doktora nauk fizycznych w zakresie biofizyki. W związku z tym wnoszę do Rady Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie mgr Mai Cieplak-Rotowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

7, 8 2022