



Wpłynęło dn. 7.09.2017
Wydział Fizyki
działek / Sekcja ds. pracowniczych
podpis *[signature]*

UNIWERSYTET IM. ADAMA MICKIEWICZA W POZNANIU

Wydział Biologii

Zofia Szweykowska-Kulińska, prof. dr hab.

Poznań, 9.08.2017

Zakład Ekspresji Genów

Recenzja pracy doktorskiej mgr Mai Cieplak-Rotowskiej zatytułowanej „Biophysical and molecular biology studies of proteins involved in gene silencing”

Praca doktorska mgr Mai Cieplak-Rotowskiej została wykonana w Zakładzie Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej, Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego, a promotorem pracy jest dr hab. Anna Niedźwiecka. W Zakładzie Biofizyki prowadzone są od lat badania nad RNA i białkami metabolizmu RNA ze szczególnym uwzględnieniem procesu inicjacji translacji, w tym roli kapu z końca 5' mRNA i czynników inicjujących translację. Badania te są prowadzone na światowym poziomie, we współpracy z czołowymi grupami badawczymi z całego świata i świetnie publikowane. Praca doktorska mgr Mai Cieplak-Rotowskiej wpisuje się w ogólny nurt badań nad metabolizmem RNA i dotyczy niezwykle ciekawego procesu wyciszania ekspresji genów na poziomie potranskrypcyjnym, w którym udział biorą mikroRNA. Warto nadmienić, że zagadnienia dotyczące roli mikroRNA są dla Zakładu Biofizyki całkowicie nowe. U zwierząt (w tym człowieka) mikroRNA naprowadzają kompleks wyciszający ekspresję genu (RISC) do danego mRNA na zasadzie komplementarności zasad pomiędzy mRNA i mikroRNA i najczęściej wywołują zahamowanie translacji (już na etapie inicjacji translacji), a temu procesowi towarzyszy zazwyczaj degradacja mRNA. Szczegóły tego procesu są obecnie przedmiotem gorącej, silnie konkurencyjnej pracy badaczy z różnych grup, a szczególnie grupy prof. Elisy Izaurralde (Instytut Maksa Plancka w Tybindze, prof. Witolda Filipowicza (Instytut Friedricha Mischera w Bazylei) i prof. Nahuma Sonenberga (Uniwersytet McGill w Montrealu). Prace tych grup doprowadziły do identyfikacji elementów maszynarii odpowiedzialnej za degradację mRNA indukowanej związaniem mikroRNA i częściowego zrozumienia szczegółów tych procesów. W kompleksie RISC głównym białkiem wyciszającym jest białko z rodziny Argonaute, które oddziałuje między innymi z białkiem GW182. To białko z kolei oddziałuje z kompleksem deadenylującym CCR4-NOT poprzez białko CNOT1. Następnie dochodzi do usunięcia kapu



(białka DCP1 i DCP2) i dalej egzorybonukleaza XRN1 degradowuje mRNA w kierunku 5'-3'. W pracy doktorskiej podjęto wyzwanie poznania szczegółów oddziaływań białka GW182 i kompleksu CCR4-NOT, a szczególnie białka CNOT1. Z uwagi na fakt, że białko GW182 jest w dużej swojej części białkiem samoistnie nieuporządkowanym co sprawia, że nie poznano dotychczas jego całej struktury przestrzennej, a jedynie niewielkie fragmenty (np. domenę wiążącą RNA – RRM) inne metody, takie jak NMR i badanie wymiany izotopowej wodoru – deuter w białku sprzężone z wysokosprawną chromatografią cieczową i spektrometrią mas (HDX MS) są obiecującymi metodami do badań szczegółów oddziaływań GW182 – CNOT1. Białka z rodziny GW182 mają zasadniczo dwie domeny funkcjonalne – N-terminalną oddziałującą z białkiem z rodziny Argonaute i domenę wyciszającą (SD – Silencing Domain) odpowiedzialną za wyciszenie ekspresji mRNA. Mgr Maja Cieplak-Rotowska zajęła się badaniem szczegółów oddziaływań domeny SD (i jej poszczególnych fragmentów) z białkiem CNOT1. Warto nadmienić, że białko CNOT1, oddziałuje również z tristetraproliną (TTP), a strukturę fragmentu CNOT1 oddziałującego z peptydem białka TTP opisano. Białka TTP wiążą się z elementami ARE mRNA i doprowadzają do ich degradacji inicjowanej przez deadenylicację (TTP rozpoznaje CNOT1 kompleksu CCR4-NOT). Ponieważ szczegóły struktury oddziaływań fragmentów tych białek zostały poznane, Autorka tej rozprawy doktorskiej również przeanalizowała to oddziaływanie metodami biofizycznymi, zastosowanymi również do badań oddziaływań GW182-CNOT1 celem (1) weryfikacji miejsc kontaktu białek stosowaną metodą i (2) odpowiedzi na pytanie biologiczne, mianowicie, czy i jak konkurują ze sobą o białko CNOT1 GW182 i TTP. Autorka wybrała HDX MS jako metodę najmniej ingerującą w strukturę i dynamikę jej zmian w białku. Cel badań – poznanie szczegółów oddziaływań domeny SD GW182 i CNOT1 i oddziaływań trójskładnikowego kompleksu GW182 – CNOT1 – TTP uważam za ambitny, a uzyskanie odpowiedzi na główne jak i szczegółowe pytania – bardzo ważne z poznawczego punktu widzenia.

Pierwszym dużym osiągnięciem Doktorantki była identyfikacja i charakterystyka miejsc wiązania w domenie SD białka TNRC6C (ortolog ludzki GW182) z CNOT1. Prace te były wykonane w laboratorium Nahuma Sonenberga i pozwoliły scharakteryzować dwa miejsca oddziaływań z CNOT1 nazwanymi CIM1 i CIM2 (od CCR4-NOT interacting motif).



W doświadczeniach typu pull down Autorka wykazała specyficzne wiązanie CIM1 z CNOT1, a doświadczenia zostały przeprowadzone z zachowaniem wszystkich niezbędnych kontroli w postaci zmutowanych form fragmentów domeny SD jak i kontroli negatywnych. Motyw CIM2 został zidentyfikowany jako uczestniczący *in vitro* w miRNA-zależnej deadenylacji mRNA przez kogoś innego lecz Doktorantka wykazała które z fragmentów aminokwasowych (1595-1690) CIM2 i RRM są istotne w deadenylacji i wiązaniu CCR4-NOT. Dalsze uszczegóławianie sekwencji wiążącej CCR4-NOT i odpowiedzialnej za deadenylację pozwoliło na zawężenie sekwencji do pozycji 1635-1665. W obrębie tego fragmentu analizy bioinformacyjne przyrównania sekwencji aminokwasowej GW182 z różnych organizmów pozwoliły na identyfikację dwóch takich samych sekwencji trój-aminokwasowych LWG w badanym rejonie. Istotnie, mutacja fragmentu genu zmieniająca obie sekwencje znosiła praktycznie deadenylację i wiązanie CCR4-NOT. Co ciekawe badania innych pokazały, że CIM2 wiąże CCR4-NOT poprzez CNOT9 ale wymagana jest do tego obecność CNOT1. Następnie Autorka odpowiedziała na pytanie jakie są funkcje poszczególnych subdomen CIM1 i CIM2. Okazało się, że CIM1 wiąże CCR4-NOT znacznie wydajniej niż CIM2. Natomiast w procesie deadenylacji znacznie większe znaczenie ma CIM2 niż CIM1: wiązanie CCR4-NOT poprzez CIM1 umożliwia jedynie usunięcie około 15 reszt A z ogona poliA mRNA, natomiast wiązanie CCR4-NOT poprzez CIM2 usuwa znacznie więcej reszt A z ogona poliA. Tutaj mam pytanie do Doktorantki: czy uważa Pani, że rolą CCR4-NOT poprzez związanie z CIM1 i CIM2 będzie dwustopniowa deadenylacja poliA mRNA – taka że wiązanie poprzez CIM1 inicjuje proces, a poprzez CIM2 prowadzi elongację deadenylacji? Czy sądzi Pani, że w kompleksie CCR4-NOT są dwie różne aktywności deadenylujące? Taki dwustopniowy mechanizm opisano przykładowo w syntezie poliA: polimeraza poliA jest nieprocesywna na początku dodawania reszt A, a potem, po przyłączeniu białek PABP, nabiera procesywności. W całym białku GW182 są oba motywy CIM1 i CIM2 i sądzę, że przyłączany jest jeden kompleks CCR4-NOT – poprzez CIM1 – z CNOT1 i CIM2 – z CNOT9. Początkowo konformacja kompleksu może stymulować usuwanie kilku reszt A, a potem, po zmianie konformacji kompleksu (oddziaływanie z białkami PABP, których ubywa), zmienia się procesywność tej samej aktywności deadenylującej? Będę ciekawa opinii



Doktorantki podczas obrony pracy doktorskiej. Tę część rozprawy uważam za niezwykle interesującą, a uzyskane wyniki za bardzo ważne dla zrozumienia procesu deadenylacji mRNA zależnej od mikroRNA.

Kolejnym ogromnym wyzwaniem Doktorantki było uzyskanie potrzebnych ilości badanych fragmentów białka GW182 (TNRC6C) do badań biofizycznych. Zmagania z nadekspresją fragmentów białka TNRC6C, zmiany metek, plazmidów, warunków indukcji, zwiększania czystości uzyskanych produktów są opisane w kolejnych podrozdziałach części Wyników i Dyskusji. Przyznam, że końcowy efekt zmagania jest imponujący: Autorka zdołała podwyższyć wydajność izolacji (w zależności od fragmentu białka) od czterokrotnie do kilkudziesięciokrotnie. Z racji bycia recenzentem rozprawy chcę zauważyć, że powołuje się Pani na Rysunek 33, a takiego w pracy nie ma; na Rysunku 38 brak jest podpisów A i B; linie żelu na zdjęciu 41 nie są mianowane

Badania fluorescencyjne i termofluorescencyjne uzyskanych fragmentów białka SD10 (zawiera CIM1, PAM2 i RRM) potwierdziły ich samoistne nieuporządkowanie. Doświadczenia HDX-MS badanego fragmentu również potwierdziły, że subdomeny CIM1 i PAM2 są mocno nieustrukturyzowane podczas gdy domena RRM jest silnie ustrukturyzowana. Co ciekawe, badanie wymiany wodoru na deuter w czasie wykazały duże zmiany zachodzące w rejonie domeny wiążącej RNA (RRM) sugerujące, że rejon ten zmienia się dynamicznie w czasie. Motyw RRM białka ludzkiego TNRC6C bardzo przypomina budową ten sam motyw z białka *D.melanogaster* GW182 – zawiera nietypową dla tego motywu alfa helisę ($\alpha 3$) blokującą powierzchnię kartki beta niezbędną do wiązania RNA. Brak również charakterystycznych dla tej kartki beta reszt aminokwasów aromatycznych. Sugeruje to, że domena ta nie oddziałuje z RNA lecz być może jest niezbędna do oddziaływań białko-białko. Chciałabym się w tym momencie zapytać jakie doświadczenia zaproponowałaby Pani by sprawdzić rolę badanej RRM w procesie wyciszania genów zależnym od mikroRNA? Bardzo interesowałaby mnie również odpowiedź na pytanie jak zinterpretować tak duże zmiany w wymianie wodór-deuter w czasie w rejonie RRM. Czy ostatecznie motyw ten jest stabilny czy też nie?

W kolejnym etapie pracy doktorskiej mgr Cieplak-Rotowska badała dynamikę struktury CNOT1. Do badań tych wykorzystwała jedynie fragment tego białka (800-999) o którym wiadomo, że oddziałuje z domeną SD (z CIM1) białka GW182. Badania HDX-MS potwierdziły, że fragment ten ma stabilną strukturę w roztworze, bardzo podobną do tej jaką opisano krystalizując ten sam fragment białka CNOT1.

Te opisane powyżej prace pozwoliły przejść do właściwych doświadczeń nad oddziaływaniami CNOT1 z domeną SD białka GW182. Autorka porównywała efekt HDX w przypadku oddziaływań CNOT1 (800-899) i CIM1 z efektem HDX w przypadku poznanych już oddziaływań CNOT1 z TTP. Z wcześniejszych badań wiadomym było, że TTP częściowo wnika z rowek hydrofobowy CNOT1 (800-899) wyścielony resztami Phe847, Tyr851 i Tyr900. Peptyd tworzy też mostek solny z Glu893 i wiązania wodorowe z Asn844, Gln848, Glu893 i Tyr900. Badania pokazały, że te same rejony CNOT1 podlegają zmianom pod wpływem wiązania TTP i CIM1, a także, że wydłużenie motywu CIM1 (dCIM1) znacznie polepszało wiązanie CNOT1. Po przeczytaniu tego rozdziału mam pewną wątpliwość z którą chciałabym się podzielić z Doktorantką prosząc o odniesienie się do niej: wywołane zmiany w różnych odcinkach badanego fragmentu CNOT1 w wymianie wodorów – deuter pod wpływem wiązania białko - białko, niekoniecznie oznaczają (jak sama Pani zaznacza), że widzimy rejony oddziaływań, lecz że możemy oglądać zmiany konformacyjne wywołane wiązaniem w innym miejscu. Jak zatem odróżnić miejsca oddziaływań od miejsc zmieniających się konformacyjnie pod wpływem wiązania?

Te same badania wykonano dla dłuższego fragmentu GW189 – SD10 zawierającego CIM1, PAM2 i RRM. Konkluzja tych badań jest taka, że CIM1 GW182 wiąże się to tego samego rowka hydrofobowego CNOT1 co TTP tylko w nieco inny sposób. W celu określenia tych różnic Autorka przeprowadziła szereg analiz kinetycznych wymiany wodorów-deuter w kompleksach CNOT1 z TTP, CIM1, dCIM1 i SD10. Badania te doprowadziły Autorkę do następujących konkluzji: miejsca wiązania CNOT1 dla TTP i CIM1 tylko częściowo nachodzą na siebie; pięć aminokwasów wydłużających z N-końca motyw CIM1 jest bardzo istotne dla wiązania CNOT1; wiązanie zarówno CIM1, dCIM1 oraz SD10 do CNOT1 (800-



899) wywołuje zmiany w C-końcu tego fragmentu białka, podczas gdy TTP tego nie wywołuje.

Kolejne badania miały naturę biochemiczną i analizowały asocjacje (stałe asocjacji) w kompleksach GW182 (SD10)/TTP/CNOT1. Badania te wykazały, że stała asocjacji GW182 (SD10) jest wyższa niż dla TTP. Jak sama Autorka zauważa, wyniki te nie są w zgodzie z wynikami uzyskanymi metodą HDX-MS, gdzie efekt wiązania CIM1 lub dCIM1 z CNOT1 był słabszy niż pod wpływem wiązania TTP. Chętnie usłyszałabym wytłumaczenie takich wyników. Ponadto, co uważam za bardzo ważny wynik, Autorka pokazała, że GW182 i TTP nie mogą wiązać się z CNOT1 równocześnie, a jedynie ze sobą konkurują o miejsca wiązania.

Na podstawie uzyskanych wyników Autorka zaproponowała model oddziaływań CIM1, dCIM1 i TTP z CNOT1. Porównanie szczegółów najlepszych modeli pokazuje lokalne różnice w oddziaływaniach TTP i CIM1/dCIM1 z CNOT1. Superpozycja dokowania dCIM1 i TTP w CNOT1 pokazała, że ważne z punktu widzenia oddziaływań reszty RLP i W/F lokują się w tych samych miejscach gdy związane w kompleksie z CNOT1, pomimo nieco odmiennych parametrów wiązania. To tłumaczy dlaczego oba białka nie mogą wiązać się z CNOT1 w tym samym czasie. Ponadto, N-koniec fragmentu CNOT1 oddziałuje z dCIM1 ale nie z CIM1. Autorka uważa więc, że motyw CIM1 wiążący CNOT1 powinien ulec redefinicji i objąć dodatkowo pięć aminokwasowy odcinek GW182 z N-końca CIM1. Czy Doktorantka mogłaby zaproponować doświadczenia potwierdzające wagę uzyskanych wyników *in vitro* – *in vivo*? Jestem też ciekawa czy opisano u człowieka/zwierząt zaburzenia ekspresji TTP które mogłyby zaburzać równowagę pomiędzy TTP i GW182, a tym samym doprowadzać do nieprawidłowości w regulacji poziomu mRNA kierowanego przez mikroRNA i obecność w mRNA motywu ARE?

Wszystkie wykonane analizy pozwoliły zaproponować krótki wspólny motyw aminokwasowy w GW182 i TTP wiążący CNOT1, a mianowicie RLPX ϕ gdzie ϕ oznacza aminokwas aromatyczny. Autorka proponuje by sekwencję tę uznać za sekwencję typu SLIM czyli Short Linear Interacting Motif. Zatem ta zaproponowana sekwencja typu SLIM może służyć jako hub dla oddziaływań z CCR4-NOT w procesach zależnych od mikroRNA jak i w



procesach degradacji mRNA zawierających sekwencje ARE. Ciekawe jest czy udałoby się jednak zbudować algorytm wyszukujący inne białka (poza TTP i GW182) potencjalnie oddziałujące z CNOT1 i skierowujące ten kompleks do mRNA. Chciałabym też prosić Doktorantkę by zaproponowała doświadczenia, które potwierdziłyby uzyskane dane w badaniach *in vitro* – *in vivo*.

Praca jest napisana w języku angielskim bardzo zrozumiale, jest bardzo dopracowana, zawiera bardzo dobry Wstęp znakomicie wprowadzający czytelnika w tematykę pracy. Część poświęcona wynikom jest połączona z dyskusją. Myślę, że w przypadku tej pracy składającej się z trzech głównych zagadnień – identyfikacji partnerów oddziaływań GW182 i CCR4-NOT, oczyszczania fragmentów białka GW182 i wreszcie analiz biofizycznych – połączenie części wynikowej i dyskusji jest trafne, bowiem pozwala te raczej odrębne części przedyskutować zaraz po zakończeniu każdej z części.

Praca niesie ze sobą bardzo duży ładunek poznawczy, wnosi bardzo istotne dane w rozwój biologii molekularnej. Praca ta jest również przykładem jak ważne są metody biofizyczne w uzyskiwaniu ważnych dla biologii informacji z zakresu funkcjonowania komórki. Moje uwagi i wątpliwości zawarłam w poszczególnych akapitach swojej recenzji i czekam na dyskusję w trakcie obrony pracy. Z uwagi na ciężar gatunkowy uzyskanych wyników, ogromny wachlarz zastosowanych technik badawczych wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Fizyki Doświadczalnej Wydziału Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie mgr Mai Cieplak-Rotowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, z uwagi na uzyskane wyniki (identyfikacja miejsc wiązania GW182 i CNOT1; opisanie roli CIM1 i CIM2; wykazanie, że TTP i GW182 oddziałują z tym samym rejonem CNOT oraz konkurują o miejsce wiązania; częściowe znakomite opublikowanie uzyskanych wyników i będąc przekonana, że pozostałe części zostaną również dobrze opublikowane) wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Fizyki Doświadczalnej Wydziału Fizyki UW o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.


Zofia Szweykowska-Kulińska