

Dr hab. Agata Starosta  
Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk  
Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa  
[agata.starosta@ibb.waw.pl](mailto:agata.starosta@ibb.waw.pl)  
tel. 666 996 114

Warszawa, 10.09.2021

### **Recenzja rozprawy doktorskiej Anny Salerno-Kochan**

Rozprawa doktorska zatytułowana „Structural characterisation of Mei-P26 protein – a central regulator of RNA biosynthesis during cell fate decision” została przygotowana przez Panią Anne Salerno-Kochan pod opieką promotorską dr hab. Sebastiana Glatta. Praca została przedłożona Radzie Dyscypliny Nauk biologicznych Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Głównym celem pracy badawczej przedstawionej w niniejszej dysertacji jest charakterystyka strukturalna i funkcjonalna białka Mei-P26 w interakcji z RNA. Autorka przeprowadziła optymalizację ekspresji wariantów rekombinowanego białka Mei-P26 w systemie bakteryjnym, drożdżowym i w oparciu o komórki owadzie. W jej wyniku otrzymała stabilną C-końcową domenę białka Mei-P26, która została przez autorkę wykorzystana do badań strukturalnych z wykorzystaniem krystalografii rentgenowskiej oraz do analiz biofizycznych oddziaływania C-Mei-P26 z wariantami RNA w celu ustalenia selektywności białka, to jest sekwencji nukleotydowej rozpoznawanej przez badany faktor. Badania te miały na celu przybliżenie roli białka Mei-P26 w regulacji translacji mRNA. Wyniki przedstawione w pracy są nowe, wcześniej niepublikowane i stanowią solidną podstawę do dalszych badań lub publikacji.

Praca doktorska mgr Anny Salerno-Kochan została napisana w języku angielskim. Treść pracy jest zgodna z tematem wskazanym w tytule. Układ treści jest właściwy i prawidłowy dla danego formatu. Praca jest standardowo podzielona na kilka głównych rozdziałów: Streszczenie, Wstęp, Cele Pracy, Zakres Badań, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie i Perspektywy. Autorka wykorzystwała obszerną bibliografię odwołującą się do 224 artykułów naukowych. Autorka stosuje w pracy odpowiedni dla tego formatu język i terminologię. Spis treści przygotowany jest prawidłowo. W pracy zamieszczony został spis skrótów oraz lista tabel i rycin. Praca jest przejrzysta, rzeczowa oraz starannie przygotowana. Tekst opatrzony jest 42-ma rycinami i 11-ma tabelami. Autorka w prawidłowy sposób zredagowała niniejszą pracę. Bibliografia została odpowiednio użyta w tekście i we właściwy sposób użyta w przedyskutowaniu wyników.

W pierwszym rozdziale *Wstępu*, autorka przybliżyła proces biosyntezy białka u Eukariontów. W skrócie, opisane są transkrypcja, dojrzewanie mRNA, translacja i fałdowanie łańcuchów polipeptydowych. W drugim rozdziale *Wstępu*, autorka skupia się na białkach wiążących RNA. Ogólnie opisuje ich funkcję w regulacji mRNA na różnych etapach życia i rozwoju komórki eukariotycznej, z podziałem na funkcje w



jądrze komórkowym oraz cytoplazmie. Następnie, autorka przedstawia typy domen wiążących RNA, w tym, białka z rodziny TRIM-NHL w szczegółach, w tym białka Mei-P26. Autorka przytacza opublikowane dane dotyczące roli Mei-P26 w rozwoju komórek rozrodczych u *Drosophila melanogaster*.

Następnie, autorka przedstawia szczegółowe *Cele badawcze*, których zadaniem jest charakterystyka strukturalna i funkcjonalna C-końcowej domeny białka Mei-P26 w interakcji z RNA. Dotyczą one identyfikacji motywu w mRNA rozpoznawanego przez C-Mei-P26, oraz reszt aminokwasowych C-Mei-P26 odpowiedzialnych za oddziaływanie z mRNA. W kolejnym rozdziale podany jest szczegółowy Zakres Badań podzielony na cztery główne zadania: (1) przygotowanie białka do analiz, (2) *in vitro* charakterystyka wiązania C-Mei-P26 z RNA, (3) strukturalne analizy białka oraz (4) analizy miejsca wiązania RNA.

W rozdziale *Materiały i Metody*, autorka opisuje protokoły, z których korzystała w celu realizacji zadań badawczych. Opisane jest przygotowanie konstruktów, w tym mutantów, do heterologicznej ekspresji wariantów Mei-P26 w różnych systemach ekspresji; ekspresja w skali analitycznej i preparatywnej w testowanych układach i dla wariantów Mei-P26, oczyszczanie białek rekombinowanych z wykorzystaniem etykietek. Przedstawione są również metody wykorzystane w analizach biofizycznych oraz strukturalnych dla oczyszczonego białka.

*Wyniki* autorka rozpoczyna charakterystyką *in situ* białka Mei-P26. Wykorzystując narzędzia do analiz sekwencji aminokwasowych i predykcji struktur, autorka opisuje domeny białka oraz generuje model C-końcowej domeny badanego białka. Białko Mei-P26 jest białkiem o długości 1206 aminokwasów i posiada domeny RING, B-Box 1 i 2 z palcami cynkowymi, fragment coiled-coil, filaminę oraz C-końcową domenę NHL. Na podstawie informacji o lokalizacji domen funkcjonalnych Mei-P26, autorka przygotowała konstrukty genetyczne białka Mei-P26 pełnej długości oraz krótszych form obejmujących warianty N-końca białka (11 konstruktów) lub C-końca białka (13 konstruktów). W celu poprawy stabilności białka były testowane etykietyki histydynowe, białko GST i MBP. Konstrukty były testowane w bakteryjnym systemie ekspresji. Zdecydowana większość konstruktów nie dała zadowalających wyników z powodu niskiego poziomu ekspresji lub/i nierozpuszczalnej formy białka. Jedynie konstrukt z domeną NHL<sub>908-1206</sub> Mei-P26 wykazywał ograniczoną rozpuszczalność, ale preparatywna skala ekspresji w bakteriach i oczyszczanie nie powiodły się. W systemie biosyntezy białek w drożdżach autorka testowała ekspresję pełnej długości białka Mei-P26 oraz samej domeny NTD<sub>117-531</sub>. Podjęte zostały również próby ko-ekspresji Mei-P26 ze znanymi partnerami białkowymi. Obiecujących wyników dla skali analitycznej ekspresji, nie udało się ekstrapolować do skali preparatywnej. Nie otrzymano wystarczającej ilości białka do analiz strukturalnych i biofizycznych. W kolejnym kroku, autorka testowała ekspresję białka pełnej długości oraz domen NTD<sub>117-531</sub> i NHL<sub>908-1206</sub> białka Mei-P26 w komórkach owadzych. Ekspresja w analitycznej skali pozwoliła na uzyskanie rozpuszczalnego białka dla każdego z testowanych konstruktów. W skali preparatywnej nie powiodło się oczyszczanie na dużą skalę białka Mei-P26, które było zanieczyszczone kwasem nukleinowym. Nie powiodło się również oczyszczanie domeny NTD<sub>117-531</sub> białka Mei-P26. Natomiast, z powodzeniem została oczyszczona domena NHL<sub>908-1206</sub> Mei-P26.

W drugiej części *Wyników*, autorka przeprowadza analizy biofizyczne domeny NHL<sub>908-1206</sub> Mei-P26. Wykorzystując metodę termoforezy mikroskalowej (MST) ustaliła ona, że NHL<sub>908-1206</sub> Mei-P26 wiąże jednoniciowe RNA (ssRNA). Wykorzystano oligonukleotyd poli-urydynowy (U7) i wykazano jego wiązanie do



badanej domeny ze stałą dysocjacji  $K_d=1.8 \mu\text{M}$ . Na podstawie wstępnych badań autorki, danych literaturowych i badań *in silico* partnera naukowego wytypowano sekwencje oligonukleotydowe bogate w urydyne do dalszych analiz specyficzności NHL<sub>908-1206</sub>.Mei-P26. Badano szereg oligonukleotydów o różnej długości od 7 do 10 nukleotydów różniących się pozycją i liczą urydyn w sekwencji. Zaobserwowano najniższe  $K_d=0.6 \mu\text{M}$  dla sekwencji UUUUUUACA. Wydłużanie sekwencji o kolejny nukleotyd urydylowy poprawiało wiązanie RNA. Następnie, autorka oczyściła domenę NHL białka Brat, należącego do tej samej rodziny białek, w celu porównania specyficzności wiązania RNA. Motyw opisany dla białka Brat: UUGUAAA nie jest rozpoznawany przez Mei-P26, zaś UUUUACA wiązane przez Mei-P26 nie jest rozpoznawany przez Brat. Co dowodzi wysokiej specyficzności białek z rodziny TRIM-NHL.

W trzeciej części Wyników, przedstawiona jest analiza strukturalna NHL<sub>908-1206</sub>.Mei-P26. Struktura została wyznaczona przy pomocy podstawienia molekularnego (ang. Molecular replacement) uzyskując rozdzielczość 1.8 Å. Struktura wykazuje duże podobieństwo ze znanymi domenami NHL innych białek. Niski stopień ich konserwatywności sekwencji aminokwasowych pozwala na szeroki wachlarz specjalizacji tych białek w wiązaniu wyselekcjonowanych mRNA. Nie powiodły się próby ko-krystalizacji NHL<sub>908-1206</sub>.Mei-P26 z wybranymi oligonukleotydami. Na podstawie informacji strukturalnych, zostały wytypowane reszty aminokwasowe mające udział w selektywnym rozpoznawaniu motywu RNA i przy pomocy mutagenyzy, przeprowadzono analizy mające na celu identyfikację kluczowych dla wiązania RNA aminokwasów.

W *Dyskusji* autorka rozważa powody dla których nie powiodła się ekspresja białka Mei-P26 i różnych jego wariantów. Podkreśla wyniki badań strukturalnych i biofizycznych dotyczące specyficzności wiązania RNA bogatego w nukleotydy urydylowe przez białko Mei-P26 oraz różnice w specyficzności pomiędzy białkiem Mei-P26 a innymi białkami z tej rodziny. Następnie nawiązuje do danych literaturowych odnośnie badania specyficzności Mei-P26 *in vivo*, gdzie badano jakie transkrypty oddziałują z badanym białkiem, co może przybliżyć rolę Mei-P26 w regulacji rozwoju komórki.

*Podsumowując*, autorce pracy udało się oczyścić domenę NHL<sub>908-1206</sub> białka Mei-P26 z heterologicznej ekspresji w komórkach owadzych. Oczyszczone białko zostało wykorzystane w badaniach biofizycznych do analiz specyficzności wiązania RNA. Struktura krystaliczna pozwoliła na ustalenie kluczowych dla wiązania RNA aminokwasów. W *Perspektywie*, autorka wspomina możliwości wykorzystania mikroskopii krio-elektronowej do badania struktury Mei-P26 oraz badań *in vivo* w celu zidentyfikowania natywnych mRNA regulowanych przez badane białko, oraz możliwości wykorzystania ich do badań strukturalnych.

#### *Komentarz merytoryczny:*

- Autorka podjęła bardzo szerokie próby otrzymania białka Mei-P26 do badań strukturalnych i biofizycznych. Jak wiele białek Eukariotycznych, białko okazało się trudne do ekspresji i oczyszczania. Autorce udało się pozyskać domenę NHL<sub>908-1206</sub> białka Mei-P26 do przeprowadzenia analiz.
- W pracy brakuje wstępu teoretycznego dotyczącego metodyki badawczej. Krótkie wyjaśnienia dotyczące termoforezy mikroskalowej oraz krystalografii rentgenowskiej pojawiają się dopiero w Materiałach i Metodach. Nigdzie nie jest opisane jak były liczone stałe  $K_d$ , ani jak było określane stężenie białka.

- Autorka nie wyjaśnia dlaczego nie testowano ekspresji domeny NHL<sub>908-1206</sub> białka Mei-P26 w drożdżach. Ekspresja w systemie bakteryjnym dawała podstawy do prób produkcji białka rekombinowanego w systemie drożdżowym.
- Czy były podjęte próby oczyszczenia kwasów nukleinowych, które oczyszczają się wspólnie z testowanymi wariantami białka Mei-P26? Przy wykorzystaniu jakich nukleaz były podejmowane próby doczyszczania?
- Czy były podejmowane próby ko-ekspresji z RNA mogącym oddziaływać z Mei-P26? Takie podejście mogłoby poprawić stabilność białka *in vivo* poprzez zapobieganie niepożądanym wiązaniom RNA komórek gospodarza.
- Autorka opisuje, że nie powiodła się ko-krystalizacja RNA z NHL<sub>908-1206</sub> Mei-P26. Czy były podjęte próby tak zwanego soaking'u?
- Rycina 10 jest nieczytelna, na wielu innych rycinach pojawiają się elementy nieczytelne (np. zbyt mała skala na wykresach)
- Rozprawa zawiera nieznaczne pomyłki językowe. Nie obniżają one wartości pracy.

Niniejsza praca jest *bardzo dobra*. Autorka dobrze planuje eksperymenty i rozwiązuje napotkane trudności. Badania są oryginalne i z pewnością będą opublikowane w bardzo dobrym czasopiśmie. Sam projekt jest rozwojowy i może stanowić podstawy dalszych badań.

Stwierdzam, że praca doktorska Pani mgr Anny Salerno-Kochan spełnia warunki określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228, z 2011 r. Nr 84, poz. 455). Zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk biologicznych Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Anny Salerno-Kochan do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauk biologicznych.



Dr hab. Agata Starosta