

## Streszczenie

Post-transkrypcyjna regulacja ekspresji genów poprzez białka wiążące RNA (*ang. RNA-binding proteins, RBPs*) jest kluczowa dla wielu procesów zachodzących w organizmach eukariotycznych. Poprzez kontrolowanie różnych etapów biosyntezy i metabolizmu RNA, białka wiążące RNA stanowią główny mechanizm pozwalający na zachowanie równowagi pomiędzy podziałami mitotycznymi, a procesem ukierunkowanego różnicowania komórek macierzystych.

Wykorzystując model wczesnego rozwoju *D. melanogaster*, wykazano występowanie sieci antagonistycznych pętli regulatorowych prowadzących do prawidłowego różnicowania komórek macierzystych w oocyty. Pierwotne komórki rozrodcze (*ang. Primordial germ cells, PGCs*) produkują białka Nos i Pum odpowiadające za samoodnawianie komórek macierzystych (*ang. stem cell self-renewal*). Szlak Nos-Pum pozostaje pod ścisłą kontrolą białka Brat oraz kompleksu białkowego utworzonego przez białka Mei-P26, Bam, Bgen i Sxl. Kompleks ten, poprzez oddziaływanie ze specyficznym mRNA (*nanosRNA*) w regionie nieulegającym translacji znajdującym się na końcu 3'mRNA (*ang. 3'untranslated region, 3'UTR*), prowadzi do zahamowania ekspresji białka Nos, kierując komórki macierzyste na drogę różnicowania. Pozostałe szlaki promujące podziały mitotyczne na drodze represji translacji czynników odpowiedzialnych za różnicowanie komórek to (I) szlak przekazu sygnału MBP (*ang. Bone Morphogenetic Protein*) oraz (II) ścieżka mikroRNA (*miRNA*).

Białko Mei-P26 jest jednym z najważniejszych czynników regulatorowych prowadzących do różnicowania komórek macierzystych poprzez (I) udział w represji szlaku Nos-Pum oraz (II) hamowanie szlaku mikroRNA na drodze oddziaływania z białkiem Ago1. Ponadto, mutacje w białku Mei-P26 powodują gromadzenie się niezróżnicowanych cyst w jajnikach i jądrach, co w rezultacie prowadzi do karcynogenezy oraz bezpłodności. Co ciekawe, Mei-P26 w pewnych warunkach może również promować samoodnawianie komórek macierzystych poprzez wspieranie ścieżki BMP. Białko Mei-P26 pełni funkcję regulatora procesu translacji, natomiast sposób jego oddziaływania z RNA nie został w pełni poznany.

Prowadzone badania naukowe w ramach przygotowanej rozprawy doktorskiej miały na celu strukturalną i biochemiczną charakterystykę oddziaływania C-końcowej domeny NHL białka Mei-P26 z informacyjnym kwasem rybonukleinowym (mRNA).

Pierwszy etap prowadzonych badań zakładał znalezienie odpowiedniego systemu ekspresji do wyprodukowania białka Mei-P26 oraz jego domen. W tym celu przetestowano ekspresję białka i jego domen w komórkach bakteryjnych, drożdżowych oraz owadzie. Użycie owadziego systemu ekspresji pozwoliło na otrzymanie domeny NHL białka Mei-P26 w ilościach pozwalających na przeprowadzenie analiz biochemicznych oraz strukturalnych.

Przy użyciu termoforezy mikroskalowej (MST) określono preferencje domeny NHL białka Mei-P26 względem różnych typów kwasów nukleinowych (DNA, jednoniciowe RNA, dwuniciowe RNA). W przeprowadzonych testach oddziaływania, potwierdzono możliwość rozpoznawania wyłącznie jednoniciowego RNA przez domenę NHL białka Mei-P26. Dodatkowo, poprzez przeprowadzenie szczegółowych analiz wiązania krótkich fragmentów oligonukleotydowych o różnych sekwencjach, dowiedziono występowania specyficznego oddziaływania między badaną domeną, a bogatymi w urydynamotywy oligonukleotydowymi.

Badania strukturalne z wykorzystaniem krystalografii rentgenowskiej pozwoliły na rozwiązanie struktury domeny NHL białka Mei-P26. Otrzymana struktura krystaliczna została następnie porównana ze znanymi domenami NHL występującymi w innych białkach, w celu określenia cech prowadzących do różnic w specyficzności substratowej pomiędzy wybranymi domenami. Stwierdzono, że pomimo wysokiego podobieństwa strukturalnego, białka te posiadają niski stopień konserwatywności aminokwasów kluczowych dla wiązania RNA oraz znacząco różną dystrybucję ładunków powierzchniowych, co może prowadzić do rozpoznawania różnych sekwencji RNA przez porównywane domeny.

W ostatnim etapie prowadzonych badań sprawdzono wpływ mutacji punktowych w domenie NHL białka Mei-P26 na siłę oddziaływania badanej domeny z krótkimi sekwencjami oligonukleotydowymi, wykorzystując narzędzia biologii molekularnej oraz eksperymenty MST. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów stwierdzono, że domena NHL białka Mei-P26 osiąga specyficzność substratową dzięki występowaniu konkretnych aminokwasów o ładunku pozytywnym na jej górnej powierzchni.

Wyniki przedstawione w pracy doktorskiej pozwoliły na uzyskanie szczegółowych informacji na temat nowego oddziaływania białko-RNA oraz przyczyniły się do lepszego zrozumienia mechanizmu regulacji rozwoju rozrodczych komórek macierzystych.

## Streszczenie pracy doktorskiej

### **Structural characterization of Mei-P26 protein - a central regulator of RNA biosynthesis during cell fate decision**

Autorka pracy: mgr Anna Salerno-Kochan

Promotor: dr hab. Sebastian Glatt

Post-transcriptional gene regulation via RNA-binding proteins (RBPs) plays an important role for many fundamental physiological processes in eukaryotes. By controlling different aspects of RNA metabolism and forming highly complex feedback loops, RBPs represent major regulators of the stem cells' fate decision.

In *Drosophila*, Primordial germ cells (PGCs) formed during embryogenesis express specific RNA regulatory proteins - Nanos (Nos) and Pumilio (Pum), which are conserved from *C. elegans* to humans and responsible for stem cells maintenance. The Nos-Pum pathway is tightly controlled by the Brat protein and a macromolecular complex composed out of four RNA-binding proteins, namely bag-of-marbles (Bam), benign gonial cell neoplasm (BgcN), meiotic P26 (Mei-P26) and sex-lethal (Sxl). The complex forms ribonucleoprotein particles (RNPs) with cis-elements present in the 3' untranslated regions (3'UTR) of the *nanos* RNA and represses Nos and Pum protein expression. The specific repression of the Nos-Pum pathway promotes stem cell differentiation and allows stem cells to switch between self-renewal and differentiation. Of note, this cellular mechanism might additionally be controlled by the bone morphogenetic protein (BMP) pathway and the microRNA (miRNA) pathway.

The Mei-P26 protein is one of the key players in the regulation of germline differentiation, as it represses the Nos-Pum pathway and binds to Argonaut (Ago1) to repress the miRNA pathway. Moreover, mutations in Mei-P26 lead to the accumulation of undifferentiated cysts, which results in tumor formation in the ovary and testis. Interestingly, the loss of Mei-P26 also impairs BMP signaling, suggesting that Mei-P26 is crucial both for stem cell self-renewal and differentiation. Mei-P26 is known to act as a translational regulator, but the detailed mechanism of its interaction with RNA has remained elusive.

The main objective of the PhD project described in the thesis was to obtain structural and mechanistic insights into the RNA recognition mode of the Mei-P26 NHL domain, which was previously reported as a hot spot for RNA recognition.

The first part of the performed research aimed at establishing an appropriate expression system to produce the Mei-P26 and its domains. Expression and purification trials performed in bacterial, yeast and insect expression systems resulted in obtaining a high amount of stable and soluble NHL domain from insect cells.

Using a Microscale thermophoresis (MST) approach the binding preferences of Mei-P26 NHL toward nucleic acids were determined in detail. Initial binding experiments for the NHL domain with different types of nucleic acids (DNA, dsRNA, ssRNA) showed that Mei-P26 NHL recognizes only ssRNA. Further analysis for the NHL domain with a variety of short oligonucleotides indicated that Mei-P26 NHL binds RNA in a sequence-specific manner by recognizing unique uridine-enriched motifs in single-stranded RNA.

The structural studies generated high-resolution information on the C-terminal domain of Mei-P26, which adopts a known propeller-like shape. The novel crystal structure of the NHL domain was compared with other known NHL domains to gain deep insights into the specificity of this domain family. It was found that, despite high structural similarities, the domains exhibit low conservation of the amino acids important for RNA recognition and differ in top surface charges distribution. Both findings may explain the observed differences in substrate specificity between known NHL domains.

Finally, structure-guided mutagenesis together with MST binding assays for single amino acid substitutions of the Mei-P26 NHL were carried out to identify those amino acids responsible for the NHL domain interaction with RNA. The obtained results showed that Mei-P26 NHL specificity toward uridine-rich motifs in RNA relies on positively charged amino acids on the top surface of the domain.

Altogether, the results described in the thesis provide information about a novel RNA-protein interaction and strongly contribute to a better understanding of the underlying molecular mechanism that guides stem cell differentiation in the germline.