

16.10.2023

Ocena rozprawy doktorskiej

mgr inż. Doroty Hudy

pt.

Różne mechanizmy działania microRNA w procesie translacji

1. Tematyka rozprawy doktorskiej

Praca doktorska p. mgr inż. Doroty Hudy dotyczy analizy molekularnych mechanizmów procesu biosyntezy białka a w szczególności translacji. Translacja jest to proces podczas którego sekwencja nukleotydów w informacyjnym RNA (mRNA) jest przepisana (przetłumaczona) na ciąg aminokwasów ułożonych w zaprogramowanej kolejności. W ostatnich 3 latach translacja była i obecnie jest gorącym tematem badawczym ze względu na wielki naukowy i komercyjny sukces szczepionek mRNA na COVID-19.

Sposób, w jaki sekwencja mRNA jest przekształcona w ciągi aminokwasów określony jest przez kod genetyczny. Natomiast tłumaczenie języka kwasów nukleinowych na język peptydów odbywa się za pomocą syntetaz aminoacylo-tRNA, głównych enzymów, które funkcjonują na pograniczu dwóch światów: świata kwasów nukleinowych i świata białek. Wynikiem tego procesu są cząsteczki aminoacylo-tRNA, w których aminokwasy są związane z kwasem nukleinowym (transferowym, przenoszącym) wiązaniem estrowym. Synteza peptydów (białek) odbywa się na rybosomach, dużych kompleksach białkowo-nukleinowych, gdzie następuje zaprogramowane w sekwencji mRNA przyłączanie kolejnych aminoacylo-tRNA do miejsc A a następnie łączenie aminokwasów wiązaniem peptydowym w miejscu P. Rybosomy zbudowane są z dwóch podjednostek, małej i dużej, każda charakteryzująca się swoistymi właściwościami umożliwiającymi precyzyjne rozpoczęcie syntezy łańcucha peptydowego, a następnie wydłużenie (elongacja) białka i poprawne zakończenie procesu tworzenia nowego funkcjonalnego białka. Powstałe łańcuchy peptydowe tworzą aktywną strukturę. Białka prawidłowo zbudowane (sfaldowane) i zmodyfikowane są transportowane do miejsc przeznaczenia. Można powiedzieć, że na tym kończy się proces ekspresji genów. Wiedzę o tym procesie można uzyskać analizując poziom informacyjnego RNA (mRNA) najczęściej przy pomocy łańcuchowej reakcji polimerazy albo poziomu (ilości) nowo syntezowanego białka.

POLITECHNIKA ŚLĄSKA

Rada Dyscypliny Inżynieria Biomedyczna

wpłynęło dnia 20.10.2023

nr 135 zał.

Białka są podstawowym składnikiem budulcowym i odpowiadają zarówno za przebieg procesów metabolicznych jak i za przekazywanie sygnałów do komórki oraz z niej wychodzących. Jednym z czynników specyficznie kontrolujących (skład białkowy) komórki (proteom) są krótkie niekodujące białek kwasy rybonukleinowe tzw. mikroRNA. W tym roku mija 30 lat od czasu ich odkrycia.

U zwierząt miRNA wiąże się do komplementarnych sekwencji mRNA znajdujących się przy końcu 3' regionów mRNA nie ulegających translacji, hamując ekspresję transkryptów, czego efektem jest redukcja ilości białka syntezowanego przez docelowe mRNA.

Dokładny mechanizm oddziaływania mirRNA z mRNA nie jest znany, a proponowane różne szlaki funkcjonowania mirRNA nie do końca są jednoznaczne i specyficzne.

Autorka pracy we wstępie do rozprawy pokrótce scharakteryzowała doniesienia o sposobach funkcjonowania mRNA, których naliczyła dziewięć.

Właśnie translacja i jej regulacja przy pomocy miRNA są głównym tematem rozprawy doktorskiej p. Doroty Hudy. Zagadnienie to jest niezwykle ważne i atrakcyjne poznawczo. Wydajna synteza białka w odpowiednim miejscu, czasie i ilości jest kluczowa dla prawidłowego funkcjonowania komórki żywej. Dlatego poznanie mechanizmów regulacji syntezy białka jest tak ważnym elementem inżynierii komórkowej, która nie tylko jest bardzo złożona ale również dynamiczna poprzez wielość składników komórkowych, ich właściwości, budowę oraz różnorodne oddziaływania.

Autorka podjęła wyzwanie zrozumienia swoistych oddziaływań krótkich miRNA z informacyjnym RNA a także z białkami, proponując konkretne eksperymenty, które po interpretacji przybliżają nas do lepszego rozumienia funkcjonowania komórki.

2. Cele pracy doktorskiej

W bardzo krótkim podsumowaniu opublikowanych prac (2 strony) dotyczących szlaków funkcjonowania miRNA autorka stwierdza, że mechanizm działania mRNA nie został wystarczająco wyjaśniony. W związku z tym jako cel badań objętych rozprawą doktorską, doktorantka postanowiła zbadać różne propozycje mechanizmów działania miRNA w procesie translacji genów reporterowych i wykazać różnice międzykomórkowe w ich funkcjonowaniu. Ten cel strategiczny rozprawy został rozpisany na 5 zadań szczegółowych:

- opracowanie warunków transfekcji linii komórkowych Me45 i HCT116 plazmidem zawierającym odpowiednio zmodyfikowane geny reporterowe,
- określenie poziomu zmian ekspresji genów reporterowych pod wpływem wybranych miRNA na poziomie mRNA i białka,

- analiza wpływu obecności transkryptów zawierających miejsca wiązania miRNA na ekspresję genów nie regulowanych przez miRNA,
- opracowanie modelu matematycznego regulacji translacji przez miRNA.

3. Wyniki badań uzyskanych i opisanych w rozprawie doktorskiej

- 3.1. Poziom mRNA genów reporterowych regulowanych i nieregulowanych przez miRNA był wyższy w komórkach czerniaka (Me 45), natomiast w komórkach raka jelita grubego (HCT 116) obserwowano większą różnicę pomiędzy transkryptami lucyferazy *Renilla* i firefly, chociaż poziom aktywności lucyferazy *Renilla* w obu liniach był podobny.
- 3.2. Zaobserwowano wysoką ekspresję miRNA-21 w obu liniach komórkowych. Była ona wyższa od tej indukowanej innymi badanymi miRNA.
- 3.3. Ekspresja miRNA z rodziny let-7 oraz miRNA-24 w obu liniach komórkowych była podobna.
- 3.4. Zmodyfikowany przy końcu 3' gen lucyferazy *Renilla* ulegał obniżonej ekspresji w komórkach HCT116 w porównaniu do genu prawidłowego.
- 3.5. Poziomy transkryptów kotransfekowanego genu lucyferazy firefly były niższe od poziomu uzyskanych transkryptów dla niezmodyfikowanego genu lucyferazy *Renilla*.
- 3.6. Pomimo podobnego poziomu mRNA, obserwowano wyższy poziom lucyferazy firefly w komórkach HCT116 i Me45.
- 3.7. Porównanie poziomów mRNA i białek w liniach komórkowych wskazuje na różnicę wydajności procesu translacji i pomimo niższego poziomu mRNA lucyferazy firefly w komórkach HCT116, ale nie w Me45, obserwowano wyższy poziom białka.
- 3.8. W przypadku ekspresji genów regulowanych przez miRNA-24 poziomy mRNA genów reporterowych były niższe, gdy w modelu badawczym nie było dodatkowych miejsc wiązania dla miRNA, natomiast poziomy lucyferaz *Renilla* i firefly były proporcjonalne do poziomów mRNA w obu liniach komórkowych.
- 3.9. Obserwowano podobny poziom mRNA lucyferazy *Renilla*, która zawierała miejsca wiązania dla mRNA z rodziny let-7 i firefly, chociaż ilość białka była wyższa dla lucyferazy *Renilla* w porównaniu do lucyferazy firefly.
- 3.10. Wydajność translacji dla genów niemodyfikowanych lucyferazy *Renilla* i firefly była wyższa w komórkach HCT116 niż w komórkach Me45. Obecność miR-24 spowodowała wzrost translacji w komórkach HCT116 i Me45, odpowiednio 2x i 11x, natomiast bez obecności miR-24 obserwowano spadek i wzrost wydajności odpowiednio w komórkach HCT116 i Me45. Podobną zależność obserwowano dla let7 i miRNA.

- 3.11. W komórkach Me45 anti-miR-21 spowodował spadek poziomu mRNA obu lucyferaz. W obu liniach komórkowych zmiany w poziomie lucyferazy firefly były niewielkie natomiast poziom lucyferazy *Renilla* był 100x większy.
- 3.12. Obserwowano wzrost poziomu mRNA lucyferazy *Renilla* w komórkach HCT116, której gen zawierał dodatkowe miejsca rozpoznawania miR-24. W komórkach Me45 poziom mRNA nie ulegał zmianie.
- 3.13. Lucyferaza *Renilla* (modyfikowana przy końcu 3') i lucyferaza firefly w obecności anti miR-24 w komórkach HCT116 wykazywały obniżoną aktywność. W komórkach Me45 efekt był odwrotny.
- 3.14. W komórkach HCT116, anti let7 mirRNA spowodował spadek poziomu mRNA, głównie 7f. W komórkach Me45, anti let7a i 7f, obserwowano spadek poziomu mRNA lucyferazy firefly i *Renilla* (7a). Zmiany w poziomach białka wywołane anti let7 były odwrotne. W komórkach Me45 poziom ten nie uległ zmianie.
- 3.15. Sedymentacja w gradiencie sacharozy wykazała akumulację transkryptów regulowanych przez miR-21 we frakcjach lekkich polisomów w komórkach HCT116 oraz we frakcji z małą podjednostką w komórkach Me45. Podobny rozkład akumulacji obserwuje się w obecności miR-24.

Przedstawione powyżej wyniki badań objętych tytułem rozprawy doktorskiej zostały opublikowane przez doktorantkę wspólnie z promotorem pracy prof. dr hab. J. Rzeszowską-Wolny w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* 23(23) 15059 (2022). *Expression of mRNA-Targeted and Non-Targeted Reporter Genes Shows Mutual Influence and Intercellular Specificity*. Niewątpliwie opublikowanie doktoratu przed jego obroną należy uznać za sukces Doktorantki.

4. Uwagi do wyników rozprawy doktorskiej

- 4.1. Przeprowadzone badania oraz ich wyniki pozwoliły Doktorantce na postawienie kilku ważnych pytań dotyczących właściwości miRNA, które dotychczas były niezauważane lub pomijane. W szczególności dotyczy to kwestii wybiórczości działania miRNA tylko na transkrypty zawierające właściwe miejsca wiązania, czy też na RNA nieposiadające takich miejsc.
- 4.2. Modyfikacja przy końcu 3' mRNA lucyferazy *Renilla* poprzez wprowadzenie dodatkowych miejsc wiązania dla miRNA powodowała zmiany poziomów mRNA i białka, czego należało się spodziewać. Trzeba również uznać, że jest to proces specyficzny. Ponadto ta zmiana strukturalna wpływała na ekspresję lucyferazy firefly, co można określić jako efekt

niespecyficzny. Zaobserwowano także zmiany poziomów mRNA i lucyferazy firefly w obecności anty miR, co wskazuje na obecność sekwencji regulowanych w transkryptach lucyferazy *Renilla* przez miRNA. Autorka słusznie zauważyła, że zarówno transkrypty lucyferaz *Renilla* i firefly z dodatkowymi miejscami wiązania miRNA lub bez nich, występują w tych samych kompleksach i procesach kontrolowanych przez miRNA. Jest to prawdopodobnie wynikiem separacji faz i tworzenia kondensatów, którym obecnie przypisuje się kluczową rolę w kontroli ekspresji genów (*A Phase Separation Model for Transcriptional Control*. Hnisz D, Shrinivas K, Young RA, Chakraborty AK, Sharp PA. *Cell* 2017, 169(1):13-23; *RNA in formation and regulation of transcriptional condensates*. Sharp PA, Chakraborty AK, Henninger JE, Young RA. *RNA* 2022, 28(1):52-57). Jest to nowy i atrakcyjny kierunek badawczy, na który Doktorantka tak odważnie już wkroczyła.

- 4.3. Inny ważny problem zauważony przez Doktorantkę dotyczy specyficzności komórkowej działania miRNA. W komórkach HCT116 oraz Me45, miRNA-21 i miR-24 funkcjonują odmiennie. Geny reporterowe różniące się sekwencjami docelowymi dla miRNA przy końcu 3' wykazywały zróżnicowany poziom ekspresji w tej samej linii komórkowej. Obecność miejsc wiązania dla miR-21 negatywnie wpływała na translację, podczas gdy miejsce wiązania miR-24 oraz let-7 stymulowało wzrost wydajności translacji. Wydaje się, że miRNA mogą wykazywać zróżnicowane właściwości uwarunkowane strukturą. Te interesujące wyniki potwierdzają obserwacje poczynione i niedoceniane 20 lat temu (*RNAa in action: from the exception to the norm*. Guo D, Barry L, Szu Hua Lin S, Huang V, Li L-C, *RNA Biol* 2014, 11(10):1221-1225; *RNA Activation-A Novel Approach to Therapeutically Upregulate Gene Transcription*. Tan CP, Sinigaglia L, Gomez V, Nicholls J, Habib NA, *Molecules* 2021, 26(21):6530).
- 4.4. Doktorantka podjęła próbę opracowania modelu matematycznego dla uzyskania odpowiedzi dotyczącej tworzenia różnych kompleksów białko-RNA zawierającym miejsca wiązania miRNA. Autorka zaproponowała szereg modeli nieliposomalnych kompleksów RNA-białko o właściwościach sedymentacyjnych podobnych do właściwości kompleksów translacyjnych, w których była symulowana ilość cząsteczek miRNA obecnych w różnych frakcjach, podobnych do tych otrzymanych eksperymentalnie oraz określiła wartości dopasowania. Modele zawierające kompleksy nieliposomalne wykazywały lepsze dopasowanie do wartości eksperymentalnych. Mimo wielu niedoskonałości, zaproponowane modele mogą przybliżać kondensaty powstające w wyniku rozdziału faz (ang. PS; liquid-liquid phase separation, LLPS).

4.5. Rozprawa doktorska p. D. Hudy liczy 80 stron. Składa się z bardzo krótkiego wstępu teoretycznego (7 stron), części eksperymentalnej, wyników badań oraz dyskusji wyników. Napisana jest jasno i zrozumiale, chociaż zbyt wiele jest żargonu laboratoryjnego i niezręcznych słów np. tRNA z metioniną, zredukowana duża podjednostka rybosomalna, do sekwencji co najmniej seeda, rozgałęzionego PEI, w końcu 3', zamodelowane kompleksy. Dużym uproszczeniem jest stwierdzenie, że używając programu RNA structure można określić strukturę mRNA dla badanych genów reporterowych.

5. Wniosek końcowy

5.1. Wyniki badań przedstawione w pracy doktorskiej mgr inż. Doroty Hudy są bogatym materiałem eksperymentalnym dotyczącym badań mechanizmu działania miRNA. Autorka pokazała, że miRNA mogą ograniczać syntezę transkryptów i białek, ale mogą także aktywować te procesy, co w literaturze nie jest często dyskutowane. Propozycja regulacji biosyntezy białka poprzez mechanizmy separacji faz jest dobrym początkiem nowego kierunku badawczego.

5.2. Stwierdzam zatem, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz. U. 22018 r., poz. 1668 z późniejszymi zmianami), ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. „Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dr.U. z 20LB r., poz. 1669 ze późniejszymi zmianami) i wnoszę do Rady Dyscypliny Inżynieria Biomedyczna Politechniki Śląskiej w Zabrze o dopuszczenie p. mgr inż. Dorotę Hudy do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

