



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii

Instytut Genetyki i Biotechnologii
Prof. dr hab. Joanna Kufel
Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa



Warszawa, 11-01-2020

Recenzja pracy doktorskiej mgr Tomasza Gulanicza pt. "PRP40 pośredniczy w komunikacji pomiędzy transkrypcją, splicingiem i biogenezą miRNA."

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Tomasza Gulanicza została wykonana pod kierunkiem Prof. dr. hab. Artura Jarmołowskiego w Zakładzie Ekspresji Genów, w Instytucie Biologii Molekularnej i Biotechnologii na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Praca dotyczy regulacji podstawowych procesów komórkowych, transkrypcji, splicingu i dojrzewania mikroRNA, u modelowego organizmu roślinnego, *Arabidopsis thaliana* i ich wzajemnego powiązania, co doskonale wpisuje się w tematykę badań prowadzonych w grupie Prof. Jarmołowskiego. Uzyskane podczas realizacji pracy wyniki nie zostały dotychczas opublikowane. Mgr Gulanicz jest współautorem artykułu w Proc. Natl. Acad. Sci. USA z 2020 r, która nie jest związana bezpośrednio z jego dysertacją. Mgr Gulanicz był kierownikiem projektu grantowego Preludium NCN oraz uzyskał stypendium ETIUDA, w ramach którego zamierza wyjechać na staż do laboratorium prof. Josefa Samaja w The Center of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Palacký University in Olomouc. Ponadto podczas doktoratu odbył także praktyki w laboratorium Frédéric'a Pontvianne we Francji.

W ostatnich latach coraz większy nacisk kładzie się na kompleksową sieć zależności pomiędzy poszczególnymi etapami ekspresji genów. Najnowsze badania pokazują dobitnie, że procesy te nie przebiegają w odosobnieniu, ale są ściśle ze sobą powiązane i często współregulowane. Dotyczy to w szczególności transkrypcji, splicingu, dojrzewania i eksportu różnych cząsteczek RNA, których optymalna ekspresja wymaga precyzyjnej koordynacji i zachowania równowagi między wydajnością a jakością. Mgr Gulanicz w swojej pracy skupił się na biogenezie niekodujących cząsteczek mikroRNA, które biorą udział w wyciszaniu ekspresji mRNA głównie na poziomie post-transkrypcyjnym. Mimo, że proces syntezy miRNA jest dość dobrze opisany, również w komórkach roślinnych, to mechanizmy regulacji i współdziałania poszczególnych etapów nie są do końca określone.

Zgodnie z przedstawionym celem badań, doktorant zajął się ustaleniem roli jednego z elementów maszynarii zaangażowanej w biogenezę miRNA, czynnika splicingowego RPR40, w komunikacji między kompleksem RNA polimerazy II a mikroprocesorem odpowiedzialnym za dojrzewanie prekursorów miRNA. Wcześniejsze badania ujawniły istnienie oddziaływań między składnikiem mikroprocesora Serrate (SE) i białkami wchodzącymi w skład cząstki rybonukleoproteinowej U1 snRNP, m.in. PRP40. Wskazano też, że brak tych interakcji zaburza przebieg zarówno splicingu jak i dojrzewania miRNA. Praca mgr Gulanicza jest

kontynuacją i poszerzeniem tych badań. Autor z wykorzystaniem przede wszystkich zaawansowanych technik mikroskopowych wykazał, że RPR40 pośredniczy w komunikacji między PolIII a mikroprocesorem, najprawdopodobniej poprzez rekrutację innych czynników, takich jak białko U1-70K oraz SE, do transkrybującego kompleksu polimerazy. PRP40 oraz SE przyczyniają się też do asocjacji kolejnego komponentu mikroprocesora, DCL1, z PolIII, natomiast dołączenie HYL1 jest niezależne od SE. Najważniejszym wnioskiem wynikającym z tych wyników jest hipoteza, że dojrzewanie miRNA przy udziale mikroprocesora odbywa się kotranskrypcyjnie i jest wspomagane przez czynniki splicingowe. Co ciekawe, lokalizacja prekursorów miRNA w strukturach subjądrowych sugeruje, że struktury te w których znajdują się pri-miRNA oraz składniki maszynarii biogenezy miRNA, nie są opisanymi dotychczas jako miejsca dojrzewania miRNA ciałkami D, ale stanowią odrębne struktury, które pokrywają się z występowaniem nowopowstających transkryptów.

Omówienie szczegółowe.

W pracy zawarto opis tematyki badań oraz przedstawiono i przedyskutowano uzyskane wyniki. Wstęp stanowi omówienie stanu dotychczasowej wiedzy dotyczącej biogenezy miRNA u *A. thaliana*, ze szczególnym uwzględnieniem roli i budowy kompleksu mikroprocesora. Mechanizm syntezy i dojrzewania miRNA jest opisany bardzo szczegółowo, ale nieco zbyt skrótowo, biorąc pod uwagę kompleksowość tego procesu, w który zaangażowane jest wiele czynników. W lepszym zrozumieniu nie pomaga schemat na rys.1 który przedstawia tylko podstawowe etapy i główne czynniki, pomijając omówione w rozdziale 1.2 liczne dodatkowe białka. Uwzględnienie na jednej rycinie wszystkich składników byłoby zapewne zbyt wymagające, ale pokazane elementy są niewystarczające do pełniejszego zilustrowania opisywanych aktywności i oddziaływań. W sposób bardziej przejrzysty przedstawiono budowę i rolę mikroprocesora, co jest szczególnie istotne dla przeprowadzonych w pracy badań. Rozdział poświęcony powiązaniu transkrypcji, splicingu i biogenezy miRNA jest najbardziej rozbudowany, co jest w zrozumiale biorąc pod uwagę charakter badań, ale jest przedstawiony w dość niezorganizowany sposób i nie do końca zawiera właściwy zestaw informacji. Opis przebiegu splicingu i cyklu transkrypcyjnego jest jednocześnie zbyt szczegółowy i „książkowy”, przekazuje wiedzę podstawową, co nie jest konieczne w takiej formie i nie wszystkie informacje są przydatne. Koordynacja transkrypcji i procesów kotranskrypcyjnych przez zmiany statusu modyfikacji domeny CTD PolIII jest procesem o wiele bardziej skomplikowanym i wcale nie tak jednoznacznym jak to przedstawił autor. Najnowsze prace z tej dziedziny ujawniły zdecydowanie większą kompleksowość tzw. kodu CTD, niż do tej pory sądzono. Autor opiera się na starszych pracach źródłowych i przeglądowych, co spowodowało, że model na rys. 4 jest nieaktualny i uproszczony, szczególnie jeśli idzie o wyższe organizmy eukariotyczne. Nie jest moim zadaniem sugerowanie jak powinien być napisany ten rozdział, ale w obecnej formie pierwsza część jest schematyczna i nieinformatywna. Druga część, bezpośrednio poświęcona połączeniu omawianych procesów, jest już lepiej ujęta, ale nadal dość chaotyczna i niedopracowana, podanych jest wiele przykładów, ale brakuje myśli przewodniej. Ogólnie, informacje dostarczone w części wstępu dają dobry wgląd w przebieg omawianych procesów i są wystarczające do dalszego śledzenia pracy, ale mogłyby być zorganizowane w bardziej spójny i przemyślany sposób. Ponadto,

liczba rycin we wstępie jest zaskakująco skąpa (tylko 4), co nie jest właściwe, ponieważ dobrze dostosowane ilustracje znacznie bardziej wspomagają zrozumienie omawianych procesów niż suchy tekst, w szczególności dotyczy to ostatniego rozdziału. Być może tabela czy schemat ujmujące istotne oddziaływania i powiązania pozwoliłyby na jaśniejsze przedstawienie tych zagadnień.

Cele pracy są określone precyzyjnie, z podziałem na konkretne zadania badawcze, a materiały i metody są opisane bardzo szczegółowo i rzeczowo.

Sekcja wyników jest bardzo obszerna i systematycznie ujęta. Przeprowadzone doświadczenia są dobrze zaplanowane i stanowią spójny ciąg logiczny, zostały bardzo starannie wykonane i dobrze opisane, a przedstawione ryciny są informatywne i wysokiej jakości. W swojej pracy autor posłużył się głównie metodami lokalizacji komórkowej białek i RNA (FISH) w jądrach komórkowych przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej i konfokalnej, ale również zastosował Proximity Ligation Assay do potwierdzenia niektórych badanych oddziaływań. Przeważająca część wyników dotyczących oddziaływań pomiędzy białkami jest oparta o badanie ich kolokalizacji, co oznacza, że nie są to dane świadczące o bezpośrednich interakcjach. Mimo to, zastosowanie analizy statystycznej do wyznaczenia współczynników kolokalizacji oraz przekonujące zdjęcia immunolokalizacji sprawiają, że wyniki są wiarygodne i obiektywne, tym bardziej, że w niektórych przypadkach zostały potwierdzone metodą PLA.

Interesujące są obserwacje wskazujące, że PRP40 istnieje i funkcjonuje w komórce również niezależnie od obecności w kompleksie U1 snRNP, ponieważ asocjuje z PolII już w fazie inicjacji transkrypcji, a jego lokalizacja pokrywa się U1 snRNA jedynie w niewielkim stopniu. Ponadto, obecność PRP40 wpływa na asocjację białka rdzenia cząstki U1 snRNP, U1-70K, z PolII. Czy było może wykonane analogiczne ale odwrotne doświadczenie, czyli zbadanie zmian kolokalizacji PRP40 z PolII przy obniżonym poziomie U1-70K (jeśli taki mutant jest dostępny)? Może jest to efekt bardziej ogólny, tzn. nieobecność któregoś ze składników U1 snRNP wpływa na zmianę obecności tej cząstki z transkrybującym kompleksem polimerazy? Przedstawione zostały także wyniki analizy kompleksów białkowych zawierających U1-70K przy użyciu koimmunoprecypitacji białek połączonej ze spektrometrią mas, uzyskane przez innego członka zespołu, które świadczą o oddziaływaniu U1 snRNP z PolII. Uwzględnienie tych danych nie wydaje się jednak konieczne, ewentualnie można je było pokazać w suplementach, ponieważ nie wnosi właściwie niczego nowego i nie tłumaczy wzrostu współwystępowania U1-70K z całkowitą pulą PolII w mutancie *prp40ab*. Proszę autora pracy o bardziej obszerne wyjaśnienia dotyczące tej obserwacji, której znaczenie jest dla mnie niejasne.

Wykorzystując kolokalizację, oraz w niektórych przypadkach PLA, badanych czynników w roślinach dzikich i odpowiednich mutantach autor ustalił wzajemną sieć zależności pomiędzy wybranymi składnikami maszynery transkrypcyjnej (PolII), splicingowej (PRP40, U1-70K, CBC) i biogenezy miRNA (SE, DCL1, HYL1 i AGO1). Wyniki te potwierdzają sekwencyjne współdziałanie tych czynników w procesie syntezy i dojrzewania miRNA. Również w tym wypadku nie uważam za konieczne pokazanie danych analizy kompleksów białkowych zawierających SE i PRP40B. Przy okazji, czy co-IP dla PRP40B ujawniło jego oddziaływanie z podjednostkami PolII? Autor o tym nie wspomina, a na Rys. S3 nie są zaznaczone.

Kolejnym etapem pracy było zastosowanie technik FISH i RNA Stellaris w izolowanych jądrach komórek roślinnych do lokalizacji prekursorów miRNA w specyficznych strukturach subjądrowych, które nie są tożsame z ciałkami D ani z ciałkami Cajal'a, ponieważ nie są w nich obecne markery tych ciałek, odpowiednio białka DCL1 oraz U3 snoRNA i U2B''. U3 nie jest jednak odpowiednim markerem, ponieważ jest obecne głównie w jąderku. Co ciekawe, jednoczesna lokalizacja pri-miRNA i nowopowstających transkryptów (bardzo imponujący eksperyment) ujawniła, że pri-miRNA akumulują się w strukturach, które pokrywają się z miejscami transkrypcji. Biorąc pod uwagę asocjację DCL1 z PolII jest zastanawiające, że w eksperymencie pokazanym na Rys. 50 nie udało się wykryć DCL1 w strukturach pri-miRNA, natomiast na Rys. 57 zaprezentowano kolokalizację pri-miR156a, DCL1 i HYL1. Proszę o wyjaśnienie tej sprzeczności. Inna interesująca obserwacja jest przesunięcie lokalizacji DCL1 i HYL1 z nukleoplazmy do ciałek D w mutantach *se* i *prp40* oraz po zahamowaniu transkrypcji.

W rozdziale wyników przedstawione są suche dane bez komentarza czy krótkiego choćby wyjaśnienia możliwych przyczyn zaobserwowanych efektów, co pozostawia pewien niedosyt i zaburza przepływ informacji. Mimo, że dyskusja zawiera omówienie tych kwestii, to jednak tak sztywny podział jest zbyt sztuczny. Ponadto, w dyskusji znajduje się zbyt wiele powtórzeń samych wyników, ma to być może na celu ich przypomnienie, ale można to było zrobić w mniej powtarzalnej formie.

Mimo tych drobnych niedociągnięć rozdział dyskusji jest systematycznie przygotowany i ciekawie napisany, w sposób świadczący o wiedzy i zaangażowaniu autora. Stanowi dobre podsumowanie wykonanej pracy, przedstawienie sformułowanych istotnych wniosków, prowadzących do modelu łączącego kolejne etapy biogenezy miRNA.

Najciekawsze sugestie wypływające z uzyskanych wyników dotyczą kilku poniższych kwestii, choć niektóre wnioski czy stwierdzenia są nieco dyskusyjne.

Autor sugeruje, że PRP40 może oddziaływać z RNAPII także poza miejscami transkrypcji, czy można pokusić się o spekulacje, gdzie takie interakcje mogą mieć miejsce? Bardzo ciekawym wynikiem jest, że w komórkach istnieje znacząca pula PRP40 poza cząstką U1 snRNP. Czy badania skład i aktywności cząstki U1 snRNP w innych organizmach wspierają możliwość, że PRP40 jest luźniej związane z U1 snRNP i jego główna funkcja może być niezależna od U1?

W dyskusji dotyczącej oddziaływania PRP40-PolII wymienione są publikacje, które przedstawiają sprzeczne wyniki i albo potwierdzają albo nie potwierdzają oddziaływania domeny WW PRP40 z PolII. Czy na ich podstawie autor mógłby przedstawić swoją opinię na ten temat?

Nieco później jako możliwe wyjaśnienie wzrostu asocjacji SE z nieufosforylowaną polimerazą w mutancie *prp40ab* autor sugeruje na podstawie wyników doświadczenia co-IP, że SE może oddziaływać z innymi podjednostkami PolII, jednak nie jest wiadome, czy są to oddziaływania bezpośrednie, a nie poprzez inne białka, wliczając PRP40. Jest to możliwe, ale wniosek ten nie jest w pełni uprawniony i wymaga dodatkowych eksperymentów, co sam autor słusznie zauważa. Czy istnieją dane z doświadczenia ChIP-seq dla PRP40, które by pozwoliły na porównanie profili asocjacji SE i PRP40 z chromatyną?

Dotychczasowe wyniki nie pozwalają w pełni określić w jaki sposób SE jest rekrutowane do swoich genomowych celi, oprócz tego, że asocjacja ta może być ułatwiana lub stabilizowana przez PRP40. Podobnie

w przypadku innych składników mikroprocesora, HYL1 i DCL1, które kolokalizują z kompleksem polimerazy, mechanizm ich rekrutacji nie jest oczywisty, obecność HYL1 z polimerazą nie wymaga ani SE ani CBC, natomiast DCL1 zależy od PRP40, SE i CBC. Na podstawie tych danych można wnioskować o istnieniu współzależności między tymi kompleksami oraz procesami transkrypcji, splicingu i dojrzewania miRNA, chociaż trudno zdefiniować określone etapy i reguły tych powiązań. Autor przedstawił jednak zgrabny i spójny model, który jest zgodny z uzyskanymi danymi i przekonujący. Nie wszystkie elementy tego modelu są poparte twardymi danymi (np. zmiana asocjacji HYL1 w zależności od statusu jego fosforylacji), ale kolejne badania powinny wyjaśnić istniejące wątpliwości. Mam jednak jedno istotne zastrzeżenie. Autor wielokrotnie podkreśla, że istnieje wiele przesłanek, że biogeneza miRNA u roślin zachodzi kotranskrypcyjnie. Uzyskane przez niego wyniki oraz inne dane pochodzące z prac grupy Prof. Jarmołowskiego wspierają model kotranskrypcyjnego składania kompleksu mikroprocesora. Autor nie poświęcił jednak należytej uwagi wynikom z publikacji Speth et al., wg. których SE asocjuje głównie z genami kodującymi białka, preferencyjnie bezintronowymi (ok 50%), a tylko z 9 z 325 genów miRNA. Autorzy pracy wnioskuje więc, że ich wyniki nie wspierają modelu kotranskrypcyjnego dojrzewania miRNA. Jest to istotna sprzeczność, proszę więc o omówienie tych kwestii. Ponieważ wyniki polegają na kolokalizacji badanych czynników, bardziej uzasadnioną hipotezą na podstawie obecności prekursorów miRNA oraz mikroprocesora w miejscach transkrypcji razem z PolII może być raczej kontrtranskrypcyjne składanie kompleksów biorących udział w biogenezie miRNA niż kotranskrypcyjny przebieg tego procesu. Istotnym aspektem ujętym w pracy jest potwierdzenie, że składanie mikroprocesora jest zależne od transkrypcji oraz wykazanie, że, wbrew powszechnym mniemaniom, prekursor miRNA nie gromadzi się w ciałkach D, tylko w nielicznych (1-2) dyskretnych loci, gdzie najprawdopodobniej zachodzi ich dojrzewanie, natomiast ciała D są raczej miejscem przechowywania składników mikroprocesora. Nie do końca zgadzam się z sugestią, że ciała D mogą stanowić miejsca powstawania mikroprocesora (w punkcie 5 podsumowania wyników pracy), skoro składanie tego kompleksu wymaga aktywnej transkrypcji oraz obecności pri-miRNA, a także, jak sam autor proponuje w swoim modelu, zachodzi sekwencyjnie dzięki oddziaływaniom z PolII. Ostatnim punktem dyskusji są rozważania dotyczące roli białka AGO1 w jądrze komórkowym, w szczególności w regulacji transkrypcji i/lub splicingu, co jest możliwe biorąc pod uwagę sieć interakcji AGO1 z PolII i czynnikami splicingowymi. Dziwi trochę, że autor w tym miejscu nie opiera się na pracy przeglądowej Bajczyk et al., 2019, która jest poświęcona tym zagadnieniom. Autor sugeruje, że „AGO1 może pełnić jakąś funkcję w procesie transkrypcji”, tak jakby było to jedynie przypuszczenie, a nie zostało niedawno wykazane w publikacji, którą autor sam cytuje, ale nie omawia jej wyników (Liu et al., 2018). Ponadto, autor zastanawia się, czy zależne od SE oddziaływanie AGO1 z kompleksem PolII nie świadczy o związku AGO1 ze splicingiem, zapominając, że SE jest również, a być może nawet głównie, zaangażowane w regulację transkrypcji. Interesująca natomiast jest sugestia, że asocjacja AGO1 z miRNA może zachodzić kotranskrypcyjnie, jest to na razie daleko idąca hipoteza, ale zdecydowanie warta dalszych badań. Finalne wnioski są właściwie powtórzeniem punktów podsumowania wyników z poprzedniej strony. Wystarczyłoby ich zebranie w jedno zestawienie.

Dysertacja jest napisana poprawnym językiem, w sposób jasny i zrozumiały, oraz jest starannie opracowana pod względem struktury i zawartości. W niektórych rozdziałach, szczególnie we wstępie, autor nie uniknął pewnych nużących powtórzeń i schematycznych uproszczeń, ale nie jest to szczególnie rażące.

Podsumowując, mgr Tomasz Gulanicz wykonał solidną pracę doświadczalną na wysokim poziomie, a przedstawione wyniki i ich interpretacja są spójne i nie budzą zastrzeżeń. Rozprawa spełnia ustawowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim, wnioskuję zatem do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne UAM o dopuszczenie pana mgr Tomasza Gulanicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Uwagi szczegółowe:

1. Bardzo nieliczne błędy językowe, np. zbyt częste powtarzanie niektórych zwrotów, użycie terminu „rozcięcie” zamiast „przecięcie” pri-miRNA, nieszczęsny zwrot „niniejszy”....
 2. Str. 10. miRNA są zaangażowane nie tylko w posttranskrypcyjne wyciszanie ekspresji genów ale także w regulacji na poziomie transkrypcyjnym, zarówno aktywacji jak i wyciszaniu.
 3. Str. 10. Opis przykładów udziału miRNA w konkretnych procesach rozwojowych jest moim zdaniem zbyt szczegółowy.
 4. Str. 17. Nie tylko ludzkie Ars2 bierze udział w dojrzewaniu sRNA, także Ars2 u *Drosophila* (Sabin et al., 2009), można było o tym wspomnieć.
 5. Str. 40, Rys. 7 W doświadczeniu wykorzystującym Proximity Ligation Assay brakuje podstawowej kontroli negatywnej, która potwierdziłaby poprawność techniki oraz uwiarygodniła wynik pozytywny.
 6. Str 66-71, Rys 40 i 43. Dlaczego w mutancie cbc20/80 nie pokazano asocjacji PRP40, SE i DCL1 z całkowitą PolII?
 7. Str. 70, Rys. 46. Pokazanie wyników genotypowania mutantu *miR163* nie było konieczne.
 8. Str 80, Rys 51. Należało na Rys wskazać strzałkami które struktury odpowiadają CB a które oznaczają jąderka.
 9. Str. 91. Autor najpierw rozważa możliwość oddziaływania białek z domeną WW z CTD PolII przez dodatnio naładowaną argininę jak ma to miejsce dla białka Pin1, a następnie stwierdza, że nie jest to możliwe w przypadku PRP40. Wydaje się to niepotrzebne.
- Skąd pomysł, że oddziaływanie domeny WW PRP40 z CTD PolII może być stymulowane przez modyfikację polegającą na O-GlcNAcytacji?

UNIWERSYTET WARSZAWSKI
Instytut Genetyki i Biotechnologii

Prof. Joanna Kufel

Prof. Joanna Kufel