



Prof. dr hab. Jadwiga Jaruzelska
ul. Strzeszyńska 32
60-479 Poznań

tel. +48/61/657 91 00
fax +48/61/823 32 35
e-mail: jadwiga.jaruzelska@igcz.poznan.pl

www.igcz.poznan.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej

pt. Zależność biogenezy cząsteczki miR-21 od dojrzewania jej prekursorów na poziomie alternatywnego splicingu oraz poliadenylacji

Doktorant: Pan mgr Michał Sekrecki

Rozprawa została wykonana w Laboratorium Terapii Genowej UAM, pod kierunkiem kierownika tej jednostki prof. dr hab. Krzysztofa Sobczaka. MikroRNA oraz ich rola w regulacji ekspresji genów stanowią jedno z kluczowych zagadnień od ponad 20 lat. Większość prac skupia się obecnie nad pomiarem poziomu ekspresji miRNA oraz interakcją z docelowymi mRNA w kontekście chorób, najczęściej nowotworowych. Natomiast znacznie mniej miejsca poświęcono mechanizmom regulacji poziomu ekspresji samych mikroRNA. Przedstawiona rozprawa w niezwykle interesujący sposób podejmuje tę kwestię i pokazuje jej złożoność. Wybór padł na miR-21, skoro jego znaczenie jako ważnego czynnika w rozwoju organów a jednocześnie onkogenu zostało bardzo dobrze udokumentowane. Dobór bardzo precyzyjnych narzędzi molekularnych, odpowiedniego modelu badań oraz przyjęcie bardzo logicznego planu doświadczalnego, pozwoliły Autorowi w biogenezie miR-21 uwidocznić niezwykle znaczenie funkcjonalnej interakcji pomiędzy procesem transkrypcji pri-miR-21, wyborem miejsca poliadenylacji w kodującym go transkrypcie a splicingiem. Rozprawę przeczytałam z dużym zainteresowaniem ponieważ wzbogaciła moją wiedzę w tej dziedzinie. Nasuwa się pytanie, na ile opisany w rozprawie mechanizm jest powszechny i dotyczy biogenezy innych miRNA. Chciałabym usłyszeć w czasie obrony rozprawy pogląd Pana Sekreckiego na ten temat.

Na zjawisko opisane w rozprawie pokazujące mechanizm modulacji poziomu miR-21 w komórce nakłada się inne zjawisko. Mianowicie, jak słusznie Autor konstatuje, w komórkach nowotworowych regiony 3'UTR mRNA są zwykle znacznie krótsze i wymykają się procesowi regulacji przez miRNA oraz przez białka, których motywy oddziaływania z nimi zostają na skutek skrócenia pominięte. Zjawisko skrócenia regionów 3'UTR współgra z szybkimi podziałami komórek nowotworowych. Interesujące byłoby zbadać jaki jest mechanizm decydujący wyboru miejsca APA w komórkach nowotworowych, ale to już inna historia.

Zainteresowało mnie dlaczego porównanie ilości pri-miR-21 we frakcji jądrowej w stosunku do cytoplazmatycznej prowadzono w innej linii komórkowej fibroblastów a nie HeLa lub HSKM?

Wstęp rozprawy jest bardzo ciekawy i zawiera wiele ważnych informacji. Jeśli chodzi o poruszoną w nim rolę długich niekodujących RNA warto uzupełnić, że zawierają miejsca wiązania dla białek, np. takich które regulują poziom mRNA. Przykładem jest opublikowany przez grupę Igora Ulitsky'iego z Instytutu Weizmanna lncRNA NORAD. Okazało się, że ów lncRNA posiada miejsca rozpoznania, dla m. in. pełniące rolę posttranskrypcyjnego regulatora białka PUMILIO. Wiązanie przez NORAD białka PUMILIO powoduje derepresję docelowych mRNA tego ostatniego, co ma istotny wpływ na proteom komórkowy, skoro to białko reguluje poziom setek różnych mRNA. Warto również uzupełnić, że w konsekwencji represji przez miRNA, deadenyłowany mRNA może być magazynowany w P-bodies. W tych strukturach mają miejsce oba scenariusze, degradacja lub magazynowanie. W zmienionym układzie fizjologicznym komórki owe magazynowane mRNA są poliadenylowane i ponownie aktywne translacyjnie.

Dyskusja mniej więcej do połowy zawiera sporo informacji stanowiących powtórzenie Wstępu rozprawy lub ich poszerzenie. Właściwa dyskusja wyników rozpoczyna się dopiero w jej dziewiątym akapicie (str. 91). Jednak dalsza jej część jest bardzo ciekawa, wartościowa i inspirująca. Szczególnie zainteresował mnie model „torpedo” terminacji transkrypcji pokazujący, że powstawanie miR-21 pomimo wyboru proksymalnego miejsca cięcia/poliadenylacji pri-miR-21 jest potencjalnie możliwe. Zainteresował mnie również przedstawiony przez Autora model pokazujący potencjalny wpływ zaangażowanego w splicing białka PTBP1 oddziałującego z traktem polipirymidynowym, na biogenezę miR-21.

Autor sugeruje że ów mechanizm byłby odmienny w kontekście zdrowej komórki oraz nowotworowej.

Klarowny opis rycin jest bardzo ważnym aspektem zarówno w publikacjach jak rozprawach doktorskich, skoro na rycinach koncentruje się główna uwaga. Niestety opis kilku z nich nie jest precyzyjny lub jest niewystarczający. To utrudniło mi podążanie za wywodem Autora.

Na koniec nasuwa mi się bardziej ogólna refleksja, jak różnorodny użytek komórka czyni z danego fragmentu informacji genetycznej.

Liczne drobne uwagi:

1. Str. 5 Linia komórkowa nie jest „izolowana” a „wyprowadzana” z danej tkanki.
2. Str. 6 Skoro w rozprawie została przyjęta zasada że skrót wyraża nazwę w języku angielskim, punkt rozgałęzienia powinien posiadać skrót BP (branch point) a nie PR. Ponadto snRNP to małe jądrowe „rybonukleoproteiny” a nie „nukleoproteiny”.
3. Str. 20/21 Czy „wpięcie”/”wypięcie” alternatywnego eksonu to to samo co jego „włączenie”/”wyłączenie”?
4. Str. 21 Rycina 3. Skoro kolorem szarym oznaczono eksony konstytutywne, dlaczego w części G na tle szarego bloku występuje intron?
5. Str. 24 „całotranskryptomowe” metody analizy? Może lepiej „metody analizy całego transkryptomu” lub zastosowanie myślnika – „cało-transkryptomowe”?
6. Str. 24 Rycina 6 nie jest jasna, jeśli chodzi o jej lewą część dotyczącą CR-APA, czyli alternatywnych miejsc poliadenylacji wewnątrz ORF. Czy dwa bloki u samego dołu są w pełni zgodne ze schematem u samej góry pokazującym przerywaną linią alternatywne składanie?
7. Str. 33 Tłumaczenie słowa „readthrough” na „przeciek” jest zbyt żargonowe i w dodatku nieściśle bo słowo „przeciek” odpowiada angielskiemu słowu „leak”. Może należałoby wyrazić to zjawisko opisowo? – transkrypcja wykraczająca poza sygnał PAS?
8. Str. 38 Niezręczne zdanie „Tuż po zapłodnieniu komórka embrionalna z powodu braku odpowiednich czynników.. „ - czy chodzi o zygotę, blastomery? Używanie

pojęcia „komórka embrionalna” na tym etapie jest nieprecyzyjne. Zaangażowanie miRNA-21 w degradację matczynej mRNA jest interesującą obserwacją. Jednak degradacja matczynej mRNA u myszy ma miejsce na etapie zygoty. Już wtedy dochodzi do niewielkiej aktywacji genów zygoty, podczas gdy pik aktywacji transkrypcji ma miejsce na etapie dwóch komórek (na tym etapie zwanych blastomerami).

9. Str. 44 Rycina 9 przedstawiająca konstrukcje GFP posiada jedynie tytuł. Brak w niej opisu. Dalej na tej stronie przedstawione są primery do namnożenia pri-miR-21, jednak bez wskazania miejsc wiązania.
10. Str. 47 Opis różnicowania komórek HSkM zawiera tylko jedno zdanie o tym że pożywkę komórek zmieniono na różnicującą. To w moim przekonaniu niewystarczające.
11. Str. 48 Opis Tabel 4 i 5 jest zbyt skrótowy.
12. Str.49 Niezręczność: „poziom ilości miRNA” – czegoś tu za dużo?
13. Str. 51 Rycina 11 Konstrukcje nie są opisane.
14. Str. 52 Dlaczego w jednym nagłówku „poziom pri-miRNA” a w innym „badanie poziomu miRNA”. Czy znaczenie „poziom” jest w tym przypadku odmienne od „badanie poziomu”?
15. Str. 56 Rycina 12 wydaje się być kluczowym punktem wyjścia badań. Jednak jej opis był dla mnie niejasny i sprawiał trudność. W części A opisu zawarte są informacje których nie odnalazłam w mającej odpowiadać mu części A Ryciny, której opis miał dotyczyć. Być może podział opisu na A i B nie jest odpowiedni? Dalej w tekście Autor odwołuje się ponownie do Ryciny 12A - „Porównując poziom zakonserwowania sekwencji DNA u różnych zwierząt kręgowych można stwierdzić wysoki stopień podobieństwa regionów eksonowych (Ryc. 12A)”. Tej informacji w Rycinie brak.
16. Str. 58 Rycina 13 B Autor objaśnia: “Izoformy na schemacie ułożone są w kolejności ze względu na ich poziom ekspresji w analizowanym materiale.” Jednak nie pisze w jakim.
17. Str. 64 Rycina 16A Dlaczego nie pokazano wyniku WB wyciszania DROSHA w komórkach HSkM? Dlaczego w Rycinie 16C nie pokazano wpływu wyciszania

DROSHA na poziom pri-miR-21? Warto było dla jasności zamieścić taką informację w opisie Ryciny 16.

18. Str. 65 Autor informuje że: "Akumulacji transkryptów pri-miRNA towarzyszy jednoczesny spadek poziomu dojrzałych cząsteczek miRNA." Jednak brak ryciny która pokazywałaby ten wynik. Ponadto jaka była przyczyna wyboru linii HeLa oraz HSKM do analizy APA?
19. Str. 66 Rycina 17 Również tutaj szwankuje opis. Np. słowa "Obraz rozdziału elektroforetycznego..." w trzeciej linijce powinny być poprzedzone przez "B-C" zapisane tłustym drukiem. Ponadto w drugiej linijce opisu od dołu fragment ... "ilość transkryptu pri-miR-21 przeciekającego przez proksymalne PAS był istotnie podwyższony" – jak wyżej wspomniałam brzmi to zbyt żargonowo.
20. Str. 71 Linia przerywana w Rycinie 20B powinna być opisana.
21. Tekst zawiera sporą liczbę tzw. „literówek”.

Wniosek końcowy:

Rozprawę uważam za bardzo wartościową. Zawiera wiele cennych obserwacji mogących stanowić podstawę do dalszych badań a w przyszłości zaowocować zaproponowaniem nowych celów terapii nowotworów. W moim przekonaniu rozprawa spełnia formalne warunki stawiane rozprawom doktorskim i wnioskuję o dopuszczenie Pana mgr Michała Sekreckiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

