

Ocena rozprawy doktorskiej mgr. ŁUKASZA SZEWCA

Tytuł rozprawy: Molekularne oddziaływania pomiędzy białkami maszynarii splicingowej i poliadenylacyjnej roślin

Promotor: Prof. dr hab. Artur Jarmolowski

Określenie molekularnych determinant stojących za prawidłową obróbką transkryptów powstających jako skutek aktywności polimerazy RNA II jest ważnym celem dla badań podstawowych i nie tylko. Transkrypty te w wieloetapowym procesie angażującym wysoce złożone i dynamiczne kompleksy białkowe i rybonukleoproteinowe są modyfikowane na końcach 5', 3', a także cięte i składane. Za wycinanie intronów i łączenie ze sobą egzonów odpowiedzialny jest kompleks zwany spliceosomem, w skład którego wchodzi m.in. jądrowe cząstki rybonukleoproteinowe U1, U2, U4, U6 i U5 snRNP. Co ciekawe U1 snRNP jest najliczniej występującym snRNP w jądrze komórkowym, a opublikowane dane pokazują, że poza udziałem w splicingu U1 snRNP pełni także dodatkową funkcję. Funkcja ta to tzw. teleskrypting (ang. telescripting) polegająca na ochronie syntetyzowanych transkryptów przed zakończeniem transkrypcji, spowodowanym ich przedwczesną poliadenylacją. O ile telescripting, jego znaczenie, a także rola w nim U1 snRNP jest relatywnie dobrze poznana u człowieka, to nadal pozostaje on jednym z gorących tematów badawczych dedykowanych procesowaniu RNA u roślin. Aby zmienić ten stan rzeczy autor rozprawy, wykorzystując organizm modelowy jakim jest *Arabidopsis thaliana*, dąży do lepszego zrozumienia molekularnego mechanizmu łączącego U1 snRNP z maszyną poliadenylacyjną u roślin. Efektem tej pracy jest m.in. identyfikacja białek kompleksu poliadenylującego, które kontaktują się z U1 snRNP (białka homologiczne do podjednostek ludzkiego kompleksu CFIm od ang. mammalian Cleavage Factor I). Zidentyfikowane podjednostki AtCFI tj. białka AtCFI25, AtCFI59 oraz AtCFI68 są następnie charakteryzowane, a ich wzajemne oddziaływania opisane. Wykazano, że białko AtCFI25 tworzy rdzeń kompleksu CFI u roślin, oddziałując zarówno z AtCFI59, jak i AtCFI68. Pierwsza, biochemiczna część pracy uzupełniona jest analizami fenotypowymi wykorzystującymi pojedyncze jak i podwójne mutanty insercyjne w genach kodujących te białka. Analizy te uwypuklają m.in. znaczącą rolę białka AtCFI25 (drastyczny fenotyp) oraz potencjalną redundancję funkcji i wzajemne

zastępowanie się podjednostek AtCFI59 i AtCFI68 w kompleksie AtCFI. Klasyczne w pewnym sensie analizy fenotypowe uzupełnione zostają eksperymentami z wykorzystaniem narzędzi biologii molekularnej (e.g. RACE, RNAseq). Dzięki nim przeanalizowano rolę podjednostek kompleksu AtCFI w procesie poliadenylacji. Ujawniono, że kompleks AtCFI bierze udział w przedwczesnej poliadenylacji w intronach, co sugeruje także jego potencjalne zaangażowanie w proces hamowania poliadenylacji przez U1 snRNP (teleskrypting) u roślin. Dowiedziono także, że kompleks AtCFI jest również zaangażowany w proces formowania właściwych końców 3' transkryptów polimerazy RNA II.

Ocena formalna rozprawy

Formalna strona pracy nie budzi zastrzeżeń. Rozprawa skonstruowana została w sposób tradycyjny. Otwierają ją, poza technicznymi informacjami (źródła finansowania, spis treści, wykaz skrótów), streszczenia w języku polskim i angielskim. Oba teksty w sposób zwarty i rzeczowy opisują założenia, sposób realizacji oraz znaczenie badań. Wstęp w sposób perfekcyjnie oszczędny dobrze wprowadza czytelnika w zagadnienie definiując podstawowe pojęcia związane z szeroko rozumianym dojrzewaniem transkryptu. Ta część tekstu uzupełniona jest bardzo dobrymi poglądowymi ilustracjami oraz schematami (str. 17,20,21,23,27,32,33 i 35). Następny rozdział to cel naukowy. Kolejne sekcje to oddzielnie przedstawione materiały (rozdział 3), metody (rozdział 4) oraz wyniki i dyskusja. Całość zamykają jednostronicowe wnioski, wykaz rycin, tabel i załączników oraz bibliografia. Do pracy dołączono wersję elektroniczną (załączniki).

Ocena edytorskiej strony rozprawy

Praca napisana jest bardzo dobrze, przejrzysto, z zachowaniem właściwych proporcji pomiędzy poszczególnymi rozdziałami. To przemyślana kompozycja. Wysoko oceniam bardzo pragmatycznie pogrupowane i wkomponowane w tekst różnego rodzaju zbiory: skrótów, wykazów, tabel, załączników czy np. programów komputerowych. Ułatwia to poruszanie się po manuskrypcie (odnośniki), ocenę danych czy ich przeglądanie (załączniki DVD). Może niepotrzebne jest przy takim podejściu powtarzanie rozwinięć niektórych skrótów w tekście głównym (np. CTIF str. 19). Nie ma rażących błędów stylistycznych czy literówek. Trafne wykorzystanie ilustracji. Niekiedy drobne literówki na ilustracji w odniesieniu do tekstu (np. Ryc. 10 opis fuzji na obrazie, to samo Ryc. 14). Ilustracje jednak zasługują szczególnie na wyrazy uznania. Są nie tylko wysoce informatywne ale też estetyczne i jak całość przemyślane. To nie jest łatwe zadanie, kiedy pomyślimy o

porównaniu i przedstawieniu np. maszynerii poliadenylacyjnej zwierząt, drożdży i roślin czy roli kompleksu U1 snRNP i czynników poliadenylacyjnych w teleskrypcji (Rycina 5 i 53). Koncepcja kolorów sprawdza się w tym wypadku świetnie. Całość rozprawy to 150 stron tekstu, 52 ryciny, 2 tabele, oraz 182 cytowanych publikacji.

Ocena merytoryczna rozprawy

Rozprawę pana Łukasza Szewca otwiera dobrze zbalansowane i kompletne streszczenie. Skupia się ono bardzo krótko na definicji spliceosomu, znaczeniu w nim, ale także i w procesie jakim jest telescripting, rybonukleoproteiny U1 snRNP. Reszta tego fragmentu to syntetyczny opis najważniejszych wyników. Kolejny rozdział to wstęp. To w nim autor rozwija scenariusze dedykowane pierwotnym transkryptom i ich wieloetapowej obróbce. Od syntezy kapu na końcu 5' poprzez wycinanie intronów, splicing alternatywny, po dojrzewanie końca 3' transkryptów polimerazy RNA II. Co zrozumiałe autor poświęca najwięcej miejsca poliadenylacji i białkowej maszynerii za nią stojącej. Ta ostatnia zostaje porównana u zwierząt, drożdży i roślin uwypuklając znaczenie dla jej pełnego obrazu rezultatów opisanych w tej rozprawie. Bardzo ciekawy fragment wstępu stanowi rozwinięcie dotyczące alternatywnej poliadenylacji i jej konsekwencji. Dotyczy to zarówno zdarzeń na końcu 3' transkryptów jak i jej powiązań ze splicingiem (rejony 3' intronów). To właśnie to połączenie oraz fakt, iż poza udziałem w splicingu U1 snRNP chroni nowosyntetyzowane cząsteczki prekursorów RNA przed zbyt szybkim zakończeniem transkrypcji, spowodowanym przedwczesną poliadenylacją (teleskrypcją), pozycjonuje ten kompleks rybonukleinoproteinowy i jego oddziaływania w centrum uwagi czytelnika. Autor rozwija wątek budowa vs. funkcja U1 snRNP podkreślając jednocześnie, że pre-mRNA posiadają dodatkowe miejsca wiązania U1 snRNP, tzw. miejsca krytyczne, które nie uczestniczą w splicingu, ale są istotne w procesie hamowania przedwczesnej poliadenylacji. To ważne, gdyż dowodzi, że teleskrypcja jest procesem niezależnym od splicingu. Mając na uwadze przedstawione we wstępie informacje chciałbym w tym momencie zapytać, czy istnieje opisana/zaobserwowana jakakolwiek tendencja (ilość/rodzaj transkryptu/funkcja) występowania miejsc krytycznych w poznanych transkryptach u badanych dotąd organizmów? Warto podkreślić, iż przy całej złożoności opisywanych zjawisk są one przedstawione we wstępie bardzo przystępnie z wykorzystaniem najnowszej literatury oraz „rodzimych” doświadczeń Zakładu Ekspresji Genów (cytowania 103 i 118).

Kolejna część rozprawy to cel pracy. Dobrze określony i spójny kilkoma zdaniem podkreślającymi znaczenie proponowanych badań.

Dalszą część rozprawy stanowi opis materiałów i metod wykorzystanych podczas realizacji prezentowanych badań. Ten fragment pracy to aż 34 strony. W dużej mierze to tu znalazły miejsce w/w wykazy, tabele czy załączniki. Całość kompleta, szczegółowa. Wyróżniający się jest opis analiz bioinformatycznych. To często skracany lub żargonowo opisywany zbiór programów. Rzadko tak opisowy jak w tym przypadku.

Tradycyjnie, główny trzon pracy stanowią rozdziały, w których przedstawione i omówione zostały wyniki. Pierwsza ich część to identyfikacja m.in. białek poliadenylacyjnych powiązanych z U1 snRNP. Jest ona wynikiem przeprowadzanych w różnych wariantach (przeciwciała) immunoprecypitacji kompleksów białkowych z ekstraktu jądrowego (WT/linie transgeniczne). Identyfikacja zakończona bliższym opisem wzajemnych interakcji pomiędzy wybranymi przedstawicielami (potencjalne podjednostki roślinnego kompleksu CFI) tj. AtCFI25, AtCFI68, AtCFI59, AtFIPS5 z wykorzystaniem metody FRET-FLIM. W wyniku przeprowadzonych eksperymentów FRET-FLIM, potwierdzono oddziaływanie bezpośrednie białka AtFIPS5 z białkiem AtCFI25 oraz ustalono, że nie oddziałuje ono z białkami AtCFI68 i AtCFI59. Wykazano, że obie większe podjednostki roślinnego kompleksu CFI, AtCFI59 i AtCFI68, jak również białko AtFIPS5, oddziałują bezpośrednio z najmniejszą podjednostką roślinnego kompleksu CFI, AtCFI25. Na uwagę zasługuje ilość przeanalizowanych i jakość danych po immunoprecypitacji oraz strategia identyfikacji AtCFI59 w oparciu o transgeniczne linie *cfi25-1* komplementowane ATCFI25-GFP. Mam pytanie, czy te linie wykazywały nadal efekty fenotypowe (np. rozmiar, kształt liści) charakterystyczne dla *cfi25-1*? Myślę, że dla odbioru tego fragmentu wyników informacja zawarta na końcu podrozdziału 5.1 o dwóch genach kodujących odpowiednio AtCFIS1 i 2 oraz białka homologiczne do ludzkiego CFI68 mogłaby zostać przeniesiona na początek podrozdziału 5.3 (charakterystyka mutantów). Tu gdzie jest i jak została zaprezentowana nie wnosi wiele. Natomiast przy dyskusji/badaniach fenotypowych mutantów byłaby cenna. Tym bardziej, że „drugi” potencjalny CFI69 okazuje się być AtCFI59, co jako ID genu przewija się tylko w tabeli 1. Kolejny fragment rozprawy dotyczy właśnie charakterystyki mutantów insercyjnych w genach białek kompleksu CFI u *Arabidopsis*. Opisy fenotypów są raczej o literackim charakterze wykorzystujące określenia: np. „dramatyczny spadek” (str. 85 linia 1), bez faktycznego ilościowego odzwierciedlenia tej cechy. Dobry zabieg ze stworzeniem podwójnego mutantu *cfi25*-oraz *cfis1-1*, choć przy tym poziomie ogólności opisu fenotypu, z rezerwą podchodziłbym do stwierdzenia „nie widać”. Podwójne mutanty sprawdzają się natomiast przy analizach powiązań między AtCFI59/68 sugerując funkcjonalną redundancję. Duże wrażenie jako zadanie i wolumen pracy (większość

załączników) robi podrozdział 5.4 i identyfikacja białek oddziałujących z kompleksem CFI u *Arabidopsis thaliana*. Moim zdaniem najważniejsze jego przesłanie to znacząca rola w tych oddziaływaniach AtCFI25 (zidentyfikowanego we wszystkich koimmunoprecypitacjach) oraz AtCFI68 jako silnie asocjujący z licznymi białkami splicingowymi.

Bardzo solidnie potraktowany zostaje drugi homolog ludzkiego CFI_m25 tj. AtCFIS1. To świetny przykład dbałości o całość prezentowanej historii. Poświęcono mu cały podrozdział. Może dlatego, że mimo ogólnie bardzo niskiego poziomu ekspresji genu to białko AtCFIS1 może oddziaływać z AtCFI59/68 oraz z białkiem AtFIPS5, podobnie jak to ma miejsce w przypadku białka AtCFI25.

Sekcję wyniki zamyka seria analiz molekularnych mających ocenić zaangażowanie podjednostek kompleksu CFI w poliadenylację i splicing. To m.in. bardzo dobre wykorzystanie klasycznego 3'RACE/serii mutantów umożliwiające spozycjonowanie AtCFI25 oraz AtFIPS5 jako zaangażowanych i kluczowych dla procesu intronowej poliadenylacji. Ciekawe są analizy transkryptomowe (RNA-seq) mutantów kompleksu CFI oraz białek FIPS. Te z kolei ilustrują (i) funkcjonalne zastępowanie się w kontrolowanym procesie AtCFI68/59, (ii) znaczący wpływ obu białek dla poziomu ekspresji genów/transkryptów. Tu prosba o komentarz/rozwinięcie zawartego w Tabeli 2 rozróżnienia: pomiędzy: zmiany ekspresji genów/zmiany ekspresji transkryptów.

Dyskusja jest rozdziałem bardzo dobrze uzupełniającym całość dysertacji. Autor nie unika pytań pojawiających się w kontekście pracy, wysuwa hipotezy (np. rola BRR2, PRP8 jako potencjalnych łączników pomiędzy U1 snRNP a kompleksem CFI) oraz tworzy model opisujący badane zjawisko i partnerów biorących w nim udział. Myśląc o składowych roślinnego kompleksu CFI, mimo ciągle otwartego pytania o jego stechiometryczny skład, chciałbym poznać Pana zdanie (w świetle np. analiz fenotypowych czy molekularnych) na temat potencjalnej selektywności lub jej braku dla AtCFI25 w dobieraniu partnerów (CFI_m59/68) i jej konsekwencji.

Praca stanowi zwartą logiczną całość. Zarówno sposób przygotowania, jak i zawartość merytoryczna rozprawy pozwalają sądzić, że jej Autor jest sprawnym badaczem posiadającym ugruntowaną wiedzę (warto podkreślić/zauważyć jego udział jako co-autora w kilku bardzo dobrych publikacjach nie powiązanych bezpośrednio z wynikami przedstawionymi w rozprawie). Uważam, że praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim, stąd wnoszę o dopuszczenie mgr. Łukasza Szewca do dalszych etapów przewodu. Jednocześnie zawarte w niej wyniki oraz sposób przedstawiania skłaniają mnie także do wystąpienia z wnioskiem o jej wyróżnienie.

