



UNIwersytet Warszawski
Wydział Biologii
Instytut Genetyki i Biotechnologii

ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa

Warszawa, 18-04-2017

Recenzja pracy doktorskiej mgr Agaty Stępień pt. “Analiza zależności między maszyną biogenezy mikroRNA a spliceosomem u roślin.”

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Agaty Stępień została wykonana pod kierunkiem Prof. dr. hab. Przemysława Wojtaszka w Zakładzie Ekspresji Genów na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Jednym z istotnych procesów kompleksowej regulacji ekspresji genów w komórkach eukariotycznych jest mechanizm interferencji RNA z udziałem małych cząsteczek RNA, takich jak siRNA czy miRNA. Cząsteczki miRNA są zaangażowane w wyciszenie ekspresji głównie na poziomie post-transkrypcyjnym, szczególnie białek związanych z rozwojem i różnicowaniem komórek, a także odpowiedzią na bodźce, hormony i stres. Mimo, że biogeneza miRNA jest dość dobrze poznana, również w komórkach roślinnych, sieć oddziaływań i współzależności czynników biorących udział w tym procesie jest nie do końca zbadana.

Zgodnie z przedstawionym celem badań, w swojej pracy doktorantka podjęła się scharakteryzowania powiązań między dojrzewaniem prekursorów miRNA a splicingiem, w szczególności na poziomie oddziaływania maszyneryi zaangażowanych w oba procesy. Autorka skupiła się na trzech elementach składowych: białku SE (Serrate), jądrowym kompleksie CBC oddziałującym z kapem i składnikami cząstki rybonukleoproteinowej U1 snRNP.

W ramach swojej pracy doktorskiej autorka wskazała na możliwość istnienia potrójnego kompleksu SE-CBP20-CBP80, który jest istotny zarówno dla biogenezy miRNA jak i splicingu. Scharakteryzowała również bezpośrednie oddziaływania między SE i pomocniczymi białkami cząstki U1 snRNP i zaobserwowała, że brak tych interakcji zaburza oba badane procesy. Uzyskane wyniki wskazują, że białka SE i U1 snRNP tworzą łącznik pomiędzy mikroprocesorem i spliceosomem.

Wyniki zawarte w rozprawie zawarte w dwóch artykułach w *Nucleic Acids Research* w roku 2014 i 2016, w których mgr Agata Stępień jest, odpowiednio, drugą i równorzędną pierwszą współautorką. Prace te dotyczą zbliżonej tematyki i tworzą spójną całość. Doktorantka jest

również współautorką dwóch dodatkowych publikacji w *WIREs RNA* (praca przeglądowa) i *BMC Plant Biology*.

Omówienie szczegółowe.

Praca stanowi przedstawienie tematyki badań oraz uzyskanych wyników wraz z ich dyskusją. We wstępie autorka przystępnie omówiła stan dotychczasowej wiedzy dotyczący biogenezy cząsteczek miRNA oraz splicingu pre-mRNA u *A. thaliana*, w szczególności strukturę i funkcję cząstki U1 snRNP. Bardzo pomocne dla zrozumienia tych kompleksowych procesów są zawarte ilustracje i tabela porównująca syntezę i działanie miRNA w komórkach roślinnych i zwierzęcych. Dostarczone informacje stanowią dobre wprowadzenie do specyficznych zagadnień poruszanych w pracy. Cele pracy są jasno i precyzyjnie sformułowane i dokładnie określają zakres planowanych badań, a materiały i metody oraz wyniki wystarczająco dokładnie opisane. Autorka zastosowała cały szereg podstawowych i bardziej zaawansowanych metod molekularnych i biochemicznych, włączając RT-qPCR, detekcję miRNA sondami Taqman, translację *in vitro*, oraz techniki białkowe (np. typu pull-down) i mikroskopowe (BiFC i FRET-FLIM).

Doświadczenia przedstawione w pracy są logicznie uzasadnione i prawidłowo przeprowadzone, z odpowiednimi eksperymentami kontrolnymi, a wyciągnięte na ich podstawie wnioski przeważnie wystarczająco uprawnione. Bezpośrednie specyficzne oddziaływanie między białkiem SE i dwoma składnikami kompleksu CBC potwierdzono dwoma niezależnymi podejściami, przy zastosowaniu mikroskopowej techniki BiFC oraz metodą pull-down z użyciem rekombinowanych form białka SE i podjednostek CBC uzyskanych w translacji *in vitro*, co dodatkowo wzmacnia otrzymane wyniki. Jednak tworzenie trójskładnikowego kompleksu SE-CBP20-CBP80 na podstawie eksperymentu przedstawionego na Ryc. 15, choć bardzo prawdopodobne, nie zostało w pełni wykazane (co można dość łatwo sprawdzić), również przy użyciu immunoprecypitacji (dane z publikacji *Raczynska et al, NAR, 2014*), a jedynie zasugerowane. Ponadto, w doświadczeniu pull-down zastosowane zostały zupełnie niestechiometryczne stężenia SE i kompleksu CBC, co pozwala na potwierdzenie zachodzących interakcji, ale uniemożliwia wnioski dotyczące natury oddziaływań. Można się spodziewać, że SE wiąże CBC obecne na cząsteczce RNA (czy próbowano ustalić, czy oddziaływanie SE/CBC *in vivo* jest w jakimś stopniu zależne od RNA?), ale nie zostało to pokazane i nie jest do końca zgodne z silniejszym oddziaływaniem SE z CBP20 niż CBP80, zarówno *in vitro* jak *in vivo*. Autorka nie wyjaśnia jakie mogą być przyczyny tej obserwacji. Nie bardzo też rozumiem jakie są przesłanki do stwierdzenia (w Abstrakcie), że “kompleks ten stanowi podstawę molekularnego mechanizmu odpowiedzialnego za rolę SE i AtCBC w regulacji splicingu pre-mRNA i biogenezy

miRNA”. Czy zbadano kiedyś przebieg obu tych procesów w mutantach z zaburzonym oddziaływaniem SE/CBC?

Następnie, przy użyciu dwuhybrydowego systemu drożdżowego (Y2H) o zwiększonej specyficzności, autorka zidentyfikowała cztery białka kompleksu U1 snRNP, AtPRP39b, AtPRP40a, AtPRP40b i AtLUC7rl, które bezpośrednio oddziałują z SE, i potwierdziła te wyniki techniką pull-down oraz wykazała metodami mikroskopowymi (ko-lokalizacja, FRET-FLIM), że oddziaływania te zachodzą również w protoplastach Arabidopsis. Zastanawiający jest brak interakcji pomiędzy SE a PRP39a, oraz niepełna kolokalizacja PRP39a i PRP39n, na ile te białka i ich wzór ekspresji różnią się od siebie?

Niejako przy okazji, doktorantka zaobserwowała, że analizowane białka (SE i składniki pomocnicze U1 snRNP) nie są obecne w ciałkach Cajal’a, co sugeruje, że struktury te nie są najprawdopodobniej powiązane z dojrzewaniem prekursorów miRNA. Rola ciałek Cajal’a nie jest jasna, proponuje się, że mogą być w jakiś sposób zaangażowane w przebieg czy regulację splicing (np. składanie kompleksów splicingowych czy przechowywanie składników maszynarii splicingowej) i biogenezę i modyfikację snRNA. Z tego powodu dziwi nieco brak białek pomocniczych U1 snRNP w CB, tym bardziej, że komponent podstawowy U1A występuje w CB. Autorka sugeruje istnienie kilku subkompleksów U1 snRNP zawierających nieco inny zestaw białek pomocniczych. Czy są jakieś dane literaturowe dotyczące istnienia takich subkompleksów o różnym składzie, np. wyniki analiz spektrometrii mas?

Wykorzystując system Y2H oraz techniki mikroskopowe (kolokalizacja, FRET-FLIM) autorka zbadła również, które domeny białka SE są istotne do oddziaływań z kompleksem CBC i składnikami U1 snRNP. Z kolei zastosowanie kombinacji dwóch podejść, BiFC i FRET-FLIM, pozwoliło na ustalenie, że w oddziaływaniach między SE i białkami pomocniczymi U1 snRNP bierają również udział składniki podstawowe tej cząstki, co pokazano na przykładzie U1A.

Na podstawie lokalizacji wariantów SE, które są wyrażane w mutantach *se-1* i *se-2* i są pozbawione, odpowiednio, ostatnich 20 lub 40 aminokwasów, autorka wywnioskowała, że obecność partnerów U1 snRNP przywraca typową dla SE ziarnistość sygnału w jądrze. Nie do końca rozumiem ten wniosek, przecież eksperymenty te przeprowadzono w protoplastach z roślin dzikich Arabidopsis, w których białka te są obecne. Dla jasności należało podkreślić, że obserwacje te mogą wynikać z nadekspresji badanych białka w transfekowanych protoplastach (jeśli faktycznie ma to miejsce, patrz punkt 5 w uwagach szczegółowych). Skądinąd jest to słabszy element tego podejścia, ponieważ nadekspresja białek ma wpływ na ich subkomórkową lokalizację. Czy wiadomo, czy skupiska zawierające SE są tożsame z ciałkami D, w których lokalizuje się DCL1 i HYL1? Co ciekawe, eksperyment FRET-FLIM wykazał, że

brak 40 aa (wariant *se-2*), ale nie 20 aa (wariant *se-1*) powoduje utratę interakcji SE z U1 snRNP. Co w takim razie oznacza szczególnie “punktowy” czy ziarnisty obraz lokalizacji wariantu *se-2* (SE Δ 681-720)? Ponadto, rozbieżne są wyniki lokalizacji SE Δ 544-720 (Rys. 29) i SE Δ 681-720, które nie oddziałują z U1 snRNP i charakteryzują się typową dla SE ziarnistością, a SE Δ 702-720, które nadal częściowo oddziałuje z U1 snRNP i daje homogenny sygnał jądrowy, a ziarnisty dopiero po ekspresji partnerów U1 snRNP.

Doktorantka sprawdziła także wpływ interakcji między SE i U1 snRNP na biogenezę miRNA w roślinach *se-1* (częściowe zachowanie oddziaływania) i *se-2* (brak oddziaływania) dla dwóch rodzajów przypadków: miR159b i miR164c niezależnych od splicingu, oraz intronowo kodowanych miR1888a i miR402 (wynik z publikacji Knop, Stepien et al, NAR, 2016). Zbliżone rezultaty dla dwóch miRNA z każdej klasy potwierdzają, że zaobserwowane efekty są reprezentatywne. Zarówno dla miRNA zależnych od splicingu jak i niezależnych zaobserwowano w mutantach podwyższenie poziomu pierwotnych prekursorów i spadek form dojrzałych, z tym, że w dużo bardziej znaczącym zakresie dla miR159b i miR164c niż dla miR1888a. Interesującym spostrzeżeniem był o wiele słabszy efekt mutacji *se-2* niż *se-1* na poziom intronowych miR1888a i miR402, co zostało zinterpretowane jako stymulacja ich biogenezy przez brak interakcji SE i U1 snRNP. Wniosek, że “aktywny kompleks SE/U1 ma negatywny wpływ na dojrzewanie prekursora” jest jednak zbyt daleko idący i nie w pełni uprawniony, ponieważ obecność niekompletnego kompleksu SE/U1 w *se-1* w porównaniu do niezmodyfikowanego kompleksu w roślinach Col-0 skutkuje mniej wydajną akumulacją dojrzałego miRNA. Jest to szczególnie niejednoznaczne, biorąc pod uwagę brak informacji o ilości form białka SE w roślinach *se-1* i *se-2*, oraz fakt, że w obu mutantach *se* widoczny jest silny spadek nieintronowych miRNA. Obserwowane efekty są zapewne wypadkową dwóch funkcji SE, w splicingu i dojrzewaniu miRNA, i trudno jest wyciągnąć jednoznaczne wnioski. Jest też możliwe, że część efektów nie jest bezpośrednia. Czy w mutantach *se* został sprawdzony poziom czynników biogenezy miRNA? Wydaje się jednak słuszne podsumowanie, że oddziaływanie SE/U1 snRNP pełni rolę w koordynacji splicingu i dojrzewania miRNA, z nieco odmiennym mechanizmem działania w zależności od genomowej struktury cząsteczek miRNA.

W całym rozdziale wyników brakuje mi bardzo krótkiego podsumowania dla każdego z ważniejszych eksperymentów, w szczególności jest to kłopotliwe w przypadku wyników nie do końca spodziewanych czy niejasnych. Kwestie te są omówione w dyskusji, ale nie zawsze w wystarczający sposób.

Dyskusja i końcowe podsumowanie, ciekawie i sprawnie przedstawione, pozwalają na bardziej całościowe spojrzenie na osiągnięcia uzyskane w pracy, także w kontekście dostępnej wiedzy dla innych organizmów eukariotycznych, oraz na ocenę aspektów, które wymagają dalszych badań. W szczególności dotyczy to dodatkowych funkcji SE i kompleksu CBC oraz

identyfikacji i zbadania kolejnych pomocniczych czynników przyczyniających się do biogenezy miRNA dzięki oddziaływaniu z SE. Najważniejsze konkluzje pracy są zawarte w modelu oraz tabeli, które podsumowują mechanizm działania białka SE w biogenezie miRNA jako platformy koordynującej wiązanie innych czynników zaangażowanych w ten proces.

Dysertacja jest starannie opracowana i ujęta pod względem struktury i zawartości, napisana po polsku, przeważnie poprawnym językiem, w sposób jasny i zrozumiały.

Podsumowując, autorka zaprezentowała pracę na dobrym poziomie i nie mam zastrzeżeń dotyczących przedstawionego materiału. Rozprawa spełnia ustawowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim, wnioskuję zatem do Rady Wydziału Biologii UAM o dopuszczenie pani mgr Agaty Stępień do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Uwagi szczegółowe:

1. Nieliczne błędy czy niezręczności językowe i terminologiczne, np. „3' koniec” zamiast koniec 3', „tą regulację”, „procesowanie”, „agregatowy sygnał”, „egzon” zamiast ekson, „uszkodzenie procesu”.
2. Str. 12. Stwierdzenie, że „W przeciwieństwie do siRNA, miRNA regulują aktywność genów na etapie post-transkrypcyjnym” nie jest do końca prawdziwe, ponieważ mimo że miRNA faktycznie przeważnie działają post-transkrypcyjnie, to biorą też udział w regulacji transkrypcyjnej w jądrze, zarówno aktywacji jak i wyciszaniu ekspresji genów.
3. Str. 27-28. Ryc 5 i 6. Przedstawienie i omówienie podstawowego przebiegu i mechanizmu splicingu pre-mRNA nie było konieczne.
4. Ryc 7 i Ryc. 8. Umieszczenie wyników pochodzących z opublikowanej pracy (*Lorkovic et al, 2008*) nie jest właściwe ani potrzebne.
5. Nie jest do końca jasne pod kontrolą jakich promotorów były wyrażane badane białka, których lokalizację analizowano po przejściowej transfekcji w protoplastach *Arabidopsis*. Część konstruktorów znajdowała się w wektorach typu pSAT, a inne pSU z promotorem UBQ10. Czy w jakim stopniu użyte promotory powodują nadekspresję badanych białek w porównaniu z ekspresją endogenną?



Prof. Joanna Kufel