

Warszawa, 16.08.2017r.

Prof. dr hab. Piotr Zielenkiewicz
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
Wydział Biologii UW

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Wojciecha Rosikiewicza
„Identyfikacja i analiza ekspresji nakładających się genów u człowieka i myszy”
dla Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Analiza porównawcza genomów kręgowców i w szczególności zagadnienia nakładających się genów, od dawna stanowią specjalizację prof. Izabeli Makułowskiej. Jej dotychczasowe osiągnięcia w opisie tego zjawiska czynią ją jednym ze światowych autorytetów w tej dziedzinie.

Rozprawa doktorska mgr. W. Rosikiewicza wpisuje się w ten nurt zainteresowań kierowanego przez prof. Makułowską laboratorium i dotyczy identyfikacji i analizy ekspresji nakładających się genów u człowieka i myszy, przy czym doktorant koncentruje się na genach kodujących białka, nakładających się końcami 5'.

W odróżnieniu od szeroko badanego wpływu nakładania się genów na regulację transkrypcji, głównie poprzez lncRNA, wpływ nakładania się genów kodujących białka na różne aspekty funkcjonowania komórki, w tym także na poziom ekspresji obu genów, nie był dotychczas przedmiotem intensywnych dociekań.

Za wyborem takiego tematu badań przemawia także możliwość skorzystania z ogromu nowych danych uzyskiwanych za pomocą technologii wysokoprzepustowych. Posługując się bazą danych lokalizacji miejsc alternatywnego startu transkrypcji, znanych dla 73 ludzkich i 10 mysich bibliotek transkryptów, doktorant zidentyfikował 582 ludzkich i 113 mysich par genów nakładających się końcami 5' i spełniających warunek, że oba geny w parze kodują produkt w postaci łańcucha polipeptydowego. Następnie pary te zostały poddane analizom bioinformatycznym, których głównym,

ale nie jedynym celem była ewaluacja wpływu nakładania się genów na poziom ich ekspresji.

Poza samym wpływem nakładania się genów na poziom ekspresji mgr Rosikiewicz podjął także próbę zbadania:

- ewolucyjnego zakonserwowania zjawiska nakładania genów pomiędzy człowiekiem i myszą
- analizy ludzkich bibliotek pochodzących z życia płodowego i dorosłych tkanek ludzkich w celu określenia czy wykorzystanie nakładających się promotorów jest tkankowo-specyficzne,
- rozkładu długości nakładania i stopnia, w jakim transkrypcja jest inicjowana z rejonu nakładania (w tym celu określił doktorant zdefiniowane przez siebie współczynniki OR (/Joined OR), mówiące jaka jest proporcja pomiędzy poziomem ekspresji przypisanej do rejonu nakładania a całkowitym poziomem ekspresji genu (pary genów odpowiednio),
- ekspresji nakładających się genów gruczolakoraka płuc pod kątem mono- lub bi-alleliczności,
- identyfikacji miejsc wiązania i rodzaju wiążących się czynników transkrypcyjnych,
- wpływu transfekcji na aktywność rejonów promotorowych dla 6 linii komórkowych Beas2B, z których 4 poddano transfekcji z wykorzystaniem wyciszania genów,
- analizy skupień nakładających się par genów w kontekście sygnałów pochodzących od siedmiu modyfikacji histonów i aktywności RNA Pol II i stworzeniu modeli dla otrzymanych klastrów.

W wyniku tak szeroko zakrojonego planu badawczego otrzymał mgr Rosikiewicz bardzo wiele szczegółowych wyników. Ich omówienie przekracza ramy recenzji. Do najważniejszych uzyskanych przez doktoranta wyników badań należą te wskazujące, że:

1. Nakładające się geny mają wyższy poziom transkrypcji niż te same geny transkrybowane z nienakładających się miejsc startu. Wynik ten jest sprzeczny z intuicją i spekulacjami wynikającymi z poprzednich badań, dający się jednak wytłumaczyć niezależnością możliwych zakłóceń transkrypcji od nakładania i utrwalonymi w procesie ewolucji różnicami sił poszczególnych promotorów.
2. Nakładanie się genów jest zjawiskiem regulacyjnym a nie stałą cechą danej

pary genów, która może również ulegać ekspresji z nienakładających się miejsc startu w innej bibliotece (tkance, warunkach - także egzogennych, np. transfekcja).

Te, jak również inne otrzymane w pracy ciekawe i starannie przeanalizowane wyniki, dające odpowiedzi na wszystkie postawione powyżej zagadnienia, stanowią istotny wkład do naszej wiedzy o zachowaniu nakładających się genów w organizmach ssaczych. Rozprawę zamyka krótkie omówienie stworzonej przez mgr Rosikiewicza internetowej bazy nakładających się genów.

Sama rozprawa doktorska przygotowana jest niezwykle starannie, z dbałością o szczegóły. Układ pracy jest standardowy, a o poziomie kompetencji pokazanych we wstępie i szczegółowej analizie uzyskanych wyników może świadczyć ponad 200 cytowanych pozycji aktualnej literatury.

Jedynym drobnym niedostatkim pracy jest brak omówienia/przetestowania niewielu zmian, które wprowadza doktorant do istniejących metod - motywacji ich wprowadzenia i ewentualnego wpływu tych zmian na wyniki (dotyczy to np. 10-krotnego zmniejszenia odległości pomiędzy miejscem startu a końcem 5' genu w porównaniu do standardu bazy DBTSS, zmiany adnotacji referencyjnych na potrzeby szacowania poziomu ekspresji genów etc.). Wpływ takich modyfikacji, być może oczywisty dla osoby używającej na co dzień danego narzędzia, nie musi być jasny dla przeciętnego czytelnika rozprawy, a takimi są przede wszystkim (poza recenzentami) osoby poszukujące opisu metodyki.

Powyższa uwaga nie zmienia mojej bardzo wysokiej oceny rozprawy doktorskiej mgr. W. Rosikiewicza. Używając wachlarza metod bioinformatycznych uzyskał On wiele ciekawych wyników dotyczących nakładających się genów u człowieka i myszy, które bardzo starannie przeanalizował, wyciągając umotywowane wnioski, omówione następnie w świetle najnowszej literatury przedmiotu. Badania te zostały przedstawione we wzorowo napisanej, obszernej rozprawie.

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Wojciecha Rosikiewicza spełnia wszystkie wymogi ustawowo i zwyczajowo stawiane rozprawom doktorskim i wnioskuję o dopuszczenie doktoranta do dalszych etapów przewodu. Jednocześnie, biorąc pod uwagę liczbę i jakość uzyskanych przez mgr Rosikiewicza wyników oraz jakość rozprawy, wnoszę o wyróżnienie pracy i rozważenie zgłoszenia pracy do stosownej nagrody.



