



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. "Udział białka PC4 (*Positive Cofactor 4*) w regulacji ekspresji zależnych od replikacji genów histonów w komórkach HeLa"

Dla: Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Adama Mickiewicza

Doktorantka: Pani mgr Aleksandra Brzęk

Rozprawa Pani Aleksandry Brzęk koncertuje się na sprawdzeniu hipotezy, że białko PC4 znane jako ko-regulator transkrypcyjny, ma specyficzny wpływ na poziom ekspresji genów kodujących histony, lecz jedynie tych które ulegają ekspresji w czasie replikacji DNA, tzn. w fazie S cyklu komórkowego. Punktem wyjścia rozprawy było wykrycie w laboratorium Pani Brzęk interakcji pomiędzy białkiem CP4 a białkiem Lsm11. To ostatnie stanowi jeden ze składników cząstki U7snRNP, zaangażowanej w dojrzewanie końca 3' mRNA kodujących ten typ białek histonowych. Równie ważna w kontekście podjętych badań była wcześniej opisana interakcja pomiędzy PC4 a białkiem CstF64 ponieważ to ostatnie stanowi składnik zaangażowanych w ów proces dojrzewania, kompleksów HCC (ang. *histone cleavage complex*) oraz CPA (ang. *cleavage and polyadenylation complex*). Udział białka PC4 w tym procesie nie był dotąd znany. Zastosowanie immunoprecypitacji chromatyny w powiązaniu z ilościowym PCR uwidocznilo negatywny wpływ białka PC4 na transkrypcję histonów zależnych od replikacji. Ów negatywny wpływ dotyczył fazy S cyklu komórkowego, w której dochodzi do intensywnej syntezy tych białek. Pani Brzęk pokazała negatywny wpływ białka PC4 w tej fazie na wiązanie się polimerazy RNA II w obrębie genów kodujących powyższe histony. Ten wpływ został potwierdzony w doświadczeniu odwrotnym, wskazującym, że

obniżenie poziomu białka PC4 miało pozytywny wpływ na wiązanie się polimerazy II w obrębie genów kodujących histony zależne od replikacji. Dalszym potwierdzeniem tego wpływu w tym doświadczeniu było pokazanie wzrostu poziomu transkryptów kodujących ten typ histonów. Natomiast w fazie G1 w której transkrypcja genów kodujących histony zależne od replikacji jest niska, wzrost poziomu PC4 powodował intensywniejsze wiązanie się polimerazy II w ich obrębie. Jednak ten wzrost nie przekładał się na zwiększenie transkrypcji genów histonowych zależnych od replikacji.

Ponadto Pani Brzęk pokazała wpływ białka CP4 na dojrzewanie końca 3' mRNA kodujących histony zależne od replikacji i również to, że w tym procesie odgrywa rolę negatywnego regulatora, choć niezależnego od cyklu komórkowego. Biorąc pod uwagę obserwację, że zaburzenie regulacji ekspresji genów histonowych zależnych od replikacji wpływało negatywnie na przebieg cyklu komórkowego Autorka postanowiła sprawdzić, czy tempo wzrostu komórek z wyciszoną lub wzmożoną ekspresją PC4 ulega zmianie w stosunku do komórek kontrolnych. Pokazała negatywny wpływ białka PC4 na wzrost komórek, potwierdzony testem MTT na ich żywotność, jednak jedynie w układzie w którym wyciszała jego ekspresję. W układzie przeciwnym, czyli nadekspresji białka CP4 efektu nie uzyskała. W konfrontacji z wynikami dotyczącymi wpływu PC4 na wydajność transkrypcji i dojrzewania końca 3' mRNA histonów zależnych od replikacji Autorka przypuszcza, że obserwowany efekt na proliferację pod wpływem wyciszenia PC4 mógł być spowodowany ogólnym wzrostem wydajności syntezy histonów zależnych od replikacji. Sprawdziła, że ten efekt nie był spowodowany zmianami zawartości komórek w poszczególnych fazach cyklu życiowego ponieważ takich zmian nie zaobserwowała. Zastosowanie synchronizacji komórek pozwoliło sprecyzować, że pozytywny efekt na proliferację w stanie wyciszenia ekspresji PC4, mógł być spowodowany wywołanym pod wpływem tego działania skróceniem fazy S cyklu komórkowego.

W dyskusji Autorka interesująco interpretuje uzyskane wyniki oraz sugeruje dalsze kroki, które mogą prowadzić do lepszego poznania mechanizmu działania PC4, z jednej strony jako aktywatora zaś z drugiej represora transkrypcji histonów, w kontekście odmiennych faz (G1 wobec S) cyklu komórkowego. Rozprawa kończy się ciekawą hipotezą, że białko CP4 mogłoby funkcjonować jako strażnik poziomu indukcji ekspresji genów kodujących histony zależne od replikacji w fazie S cyklu komórkowego. Stwarza to ważną perspektywę dalszych badań.

Należy podkreślić bardzo dobre przygotowane przez Autorkę narzędzia które sprawdziła jako wiarygodne. Mam na myśli w szczególności linie komórek HeLa ze stabilną

nadekspresją oraz indukowanym wyciszeniem genu PC4 oraz linie kontrolne. Ponadto dokonała właściwego wyboru metodologii, w tym koimmunoprecypitację chromatyny w połączeniu z wysokoprzepustowym sekwencjonowaniem DNA. W szczególności, ze względu na badania PC4 w kontekście cyklu komórkowego, opracowała synchronizację komórek w fazie S i G1, jako przeciwstawne konteksty w badaniu CP4.

Drobne uwagi krytyczne:

1. Tytuł Ryciny 8 na str. 28 powinien być bardziej precyzyjny, np. „oddziaływanie PC4 z białkiem Lsm11 cząstki U7 snRNP”. Ponadto brak strzałek wskazujących opisywane białka oraz masę tych białek. Jest to istotne ponieważ w każdej ścieżce występuje więcej niż jeden prążek a ponadto blot jest dość niewyraźny. Poza tym brak informacji kto jest autorem przedstawionego doświadczenia.
2. W opisie Ryciny 9 na stronie 29 zawarta jest informacja, że jako kontrolę negatywną Ip zastosowano złożone nieopłaszczone przeciwciałem. Znacznie precyzyjniejszą kontrolą negatywną byłaby nieimmunizowana surowica. W tytule zamiast „w cyklu komórkowym” lepiej byłoby użyć sformułowania „w fazie G1 oraz S cyklu komórkowego”. Ponadto brak informacji kto wykonał to doświadczenie.
3. W komentarzu do Ryciny 10 na stronie 29 zawarta jest informacja, że poziom fosforylacji białka PC4 nie zmienia się w cyklu życiowym, gdy tymczasem na rycinie widać, że w fazie S jest o połowę niższy. Czyżby ta różnica była zbyt mała by traktować ją jako istotną? Także tutaj brak autorów przedstawionego wyniku.
4. Na stronie 26, druga linia od dołu: lepiej pasowałoby sformułowanie „ogólnych” niż „generalnych” czynników transkrypcyjnych.
5. Sformułowanie „dane w trakcie publikacji” nie jest precyzyjne. Nie wiadomo czy manuskrypt w przygotowaniu, czy wysłany do redakcji, czy w rewizji. Ponadto Autorka nie podaje autorów tych danych.
6. Co znaczy zdanie na stronie 28 w przedostatnim akapicie „badacze zbadali poziom oddziaływania pomiędzy białkami CstF64 a PC4”? Czy chodzi o ilość kompleksu wykrywanego kompleksu w komórce, więcej lub mniej?
7. Nie jest dla mnie zrozumiałe zdanie: „białko PC4 mogłoby wpływać na poziom ekspresji genów kodujących histony zależne od replikacji nie tylko na poziomie transkrypcyjnym jako ko-regulator, ale i ko-transkrypcyjnym poprzez oddziaływanie z białkiem CstF64 oraz cząstką U7 snRNP”. Jaka jest różnica pomiędzy ko-regulator transkrypcji a aktywność ko-transkrypcyjna?
8. W niektórych miejscach rozprawy pojawił się żargon. Na stronie 65 i innych wielokrotnie powtarza się zwrot „Dnazowanie komórek”. Pojęcia „doczyszczanie chromatyny” i „rozpruwanie” (choć to ostatnie jest bardzo obrazowe) nie są zbyt szczęśliwe.

9. W Rycinie 14A przy braku doksycykliny dochodzi do istotnego wyciszenia PC4 na poziomie RNA. Czy poziom 0 w rycinie 14C oznacza endogenny poziom mRNA PC4 w komórkach HeLa które nie były niczym traktowane? Dopiero dalej w tekście znajduję, że były to komórki HeLa z nadekspresją EBFP. Zastanawiam się nad oceną poziomu nadekspresji PC4 w HeLa w stosunku do komórek nietraktowanych w Rycinie 14D, ze względu na bardzo dużą różnicę w ilości nałożonego białka na niekorzyść ścieżki reprezentującej nadekspresję. Autorka ocenia wzrost na 5.6x. Zatem na ile nadekspresja faktycznie przekraczała poziom endogennego PC4?

10. Na Rycinie 17 poszczególne fazy cyklu komórkowego na wykresach (poszczególne piki) nie są oznakowane (np. G₀/G₁, S, G₂/M) a oznaczenia te występują jedynie na okrągłych diagramach.

11. Na stronie 72 raczej DNA uzyskany z chromatyny miał długość 150-700pz a nie chromatyna? Ten sam błąd występuje w opisie Ryciny 18. Czyżby były to kompleksy DNA/białko? Chyba nie, skoro supernatant po sonikacji traktowano proteinazą K oraz RNazą?

12. Na stronie 73 pomiędzy opisem o inkubacji z przeciwciałem a przygotowaniem bibliotek DNA brak opisu etapu łączącego te kroki.

13. W tekście opisującym wyniki brak wzmianki na temat Ryciny 34. Odnalazłam ją dopiero w opisie Ryciny 35.

Wniosek końcowy:

Rozprawę Pani mgr Aleksandry Brzęk uważam za bardzo wartościową i przeczytałam ją z dużym zainteresowaniem. Rozprawa poszerza wiedzę na temat mechanizmu koordynacji syntezy histonów zależnych od replikacji z cyklem komórkowym. Zawiera wiele cennych wyników a ponadto zarys perspektywy dalszych badań. Dlatego przedłożoną mi rozprawę uważam za spełniającą formalne warunki stawiane rozprawom doktorskim i wnioskuję o dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Brzęk do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, biorąc pod uwagę wartość uzyskanych wyników, wnoszę o wyróżnienie rozprawy.

