



Recenzja pracy doktorskiej mgr Mateusza Bajczyka

“Rola kompleksu NEXT w biogenezie mikroRNA”

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Mateusza Bajczyka została wykonana pod kierunkiem Prof. Artura Jarmołowskiego w Instytucie Biologii Molekularnej i Biotechnologii Wydziału Biologii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Regulacja ekspresji genów na poziomie post-transkrypcyjnym jest wielopoziomowym skomplikowanym procesem, w który zaangażowanych jest wiele białek i kompleksów białkowych. Jednym z ciekawszych aspektów tego procesu jest regulacja stabilności mRNA przez małe RNA zwane mikroRNA (miRNA). Są to krótkie około 20 nukleotydowe fragmenty RNA, które dzięki oddziaływaniu z docelowymi mRNA regulują ich stabilność i translację.

W jądrze komórkowym maszynaria służąca do obróbki i degradacji nowopowstającego RNA współzawodniczy o dostęp do substratów, co może mieć wpływ na ilość dojrzałych cząsteczek RNA eksportowanych do cytoplazmy. Mgr Bajczyk w swojej rozprawie doktorskiej prowadził badania dotyczące mechanizmu degradacji prekursorów miRNA i wpływu tego procesu na biogenezę miRNA u roślin, wykorzystując *Arabidopsis thaliana* jako organizm modelowy. Jednym z białek oddziałujących z nukleazą DCL1 odpowiedzialną za wycinanie miRNA z cząsteczek prekursorowych jest białko Serrate, które wspomaga obróbkę. Co istotne, Serrate oddziałuje również z białkami wiążącymi czapkę 7-metylloguanynową obecną na 5' końcu cząsteczek RNA syntezowanych przez RNA polimerazę II. Wykazano, że może to wpływać na proces składania pre-mRNA. Serrate jest zachowany w ewolucji i ludzki ortolog, ARS2, również odgrywa ważną rolę w jądrowym metabolizmie RNA, podobnie jak u roślin oddziałując z białkami wiążącymi czapkę. Ponadto ARS2 oddziałuje z maszynarią służącą do rozkładu RNA wspomagając kompleks NEXT odpowiedzialny za rekrutację substratów kompleksu egzozomu degradującego RNA od końca 3'. Wiedza zgromadzona dotychczas silnie sugeruje, że Serrate/ARS2 jest białkiem, które poprzez szeroką sieć oddziaływań wpływa na różne, jednak częściowo powiązane ze sobą etapy jądrowej obróbki RNA. Celem pracy było poznanie sieci oddziaływań, w które zaangażowane jest białko Serrate i zrozumienie jakie ma to znaczenie dla metabolizmu miRNA.

Ocena uzyskanych wyników

Doktorant w swoich badaniach przeprowadził dogłębne analizy proteomiczne białek oddziałujących z Serrate w *Arabidopsis thaliana*. Analizy wykazały, że podobnie jak u ludzi Serrate oddziałuje z kompleksem NEXT, białkami wiążącymi czapeczkę i kompleksem THO (kompleks wspomagające biogenezę i eksport RNA z jądra). Dalsze analizy funkcjonalne pozwoliły odtworzyć sieć bezpośrednich oddziaływań w jakie zaangażowany jest kompleks NEXT i Serrate. Co ciekawe, pomimo że sieć oddziaływań jest generalnie zachowana w ewolucji pomiędzy człowiekiem a roślinami, widoczne są pewne różnice świadczące o dynamice ewolucji posttranskrypcyjnych ścieżek regulacji ekspresji genów.

W dalszej części pracy mgr Bajczyk skupia się na konsekwencjach braku funkcjonalnego kompleksu NEXT na biogenezę miRNA. Badania wykazały, że zaburzenie funkcji kompleksu NEXT prowadzi do generalnej akumulacji prekursorów miRNA co nie ma jednak dużego wpływu na poziomy dojrzałych cząsteczek. Może to sugerować, że chociaż istnieje ciągle współzawodnictwo między degradacją prekursorów a powstawaniem dojrzałych cząsteczek miRNA, nie jest to czynnik limitujący dla regulacji poziomu dojrzałych miRNA.

Generalnie wyniki zaprezentowane w pracy są bardzo interesujące z naukowego punktu widzenia i poszerzają naszą wiedzę o ścieżkach posttranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów u roślin. Eksperymenty są dobrze zaplanowane i zaopatrzone w odpowiednie kontrole. Godna pochwały jest różnorodność wykorzystywanych technik. Nie mam większych uwag do samych wyników i ich prezentacji. Mam natomiast sugestie, które nie umniejszają mojej pozytywnej opinii na temat pracy. W przypadku analiz proteomicznych analiza poziomu wzbogacenia potencjalnych interaktorów byłaby bardziej informatywna gdyby Autor pracy zdecydował się wykorzystać „label free quantification” zamiast przeliczenia ilości analizowanych widm. W przypadku analiz transkryptomicznych jak Autor sam zauważa brak analizy RNA o pośredniej długości (30-200 nukleotydów) uniemożliwia dla niektórych miRNA analizę akumulacji produktu ubocznego obróbki po cięciu prekursora przez DCL1. Z tego powodu warto byłoby przeprowadzić dodatkowe sekwencjonowanie nakierowane na taką klasę cząsteczek.

Ocean formalnej strony pracy.

Praca ma klasyczną budowę i składa się ze wstępu, rozdziału opisującego metody, wyniki oraz z dyskusji. Bibliografia zawiera 174 cytowania. Praca jest napisana jasnym, zrozumiałym językiem dzięki czemu czytelnik nie ma problemu z jej śledzeniem, a pracę czyta się z prawdziwą przyjemnością i zaciekawieniem.

We wstępie Autor wprowadza czytelnika w tematykę pracy opisując ścieżki biogenezы oraz mechanizmy degradacji RNA. Sekcja Materiały i Metody jest dostatecznie wyczerpująca,

a jednocześnie odpowiednio zwięzła i nie mam do niej uwag krytycznych. Wyniki są opisane w sposób klarowny. Analiza i dyskusja uzyskanych wyników dowodzi, że doktorant potrafi nie tylko właściwie zaplanować eksperymenty i zastosować odpowiednie techniki do ich wykonania, ale także prawidłowo zinterpretować dane eksperymentalne, porównać z wynikami uzyskanymi przez innych oraz zaproponować prawdopodobny mechanizm badanych zjawisk. Co istotne, dyskusja jest napisana w sposób przemyślany i bierze pod uwagę obecną wiedzę w dziedzinie co świadczy dojrzałości naukowej doktoranta.

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona mi do oceny praca mgr Mateusza Bajczyka spełnia wszystkie warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 z poprawkami wprowadzonymi Ustawą z dnia 18 marca 2011 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2016 r. poz.882). Dlatego też z całym przekonaniem zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr Bajczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego i popieram wniosek o nadanie mu stopnia naukowego doktora.

Ze względu na ponadprzeciętną jakość naukową dysertacji zwracam się również do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu z prośbą o rozważenie wyróżnienia ocenianej pracy doktorskiej stosowną nagrodą.

Andrzej Dziembowski

