



NICOLAUS COPERNICUS
UNIVERSITY
IN TORUŃ

Faculty of Biological
and Veterinary Sciences

dr hab. Janusz Niedojadło, prof. UMK
Katedra Biologii Komórkowej i Molekularnej
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
ul. Lwowska 1
87-100 Toruń

Toruń, 1/02/2021

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr Tomasza Gulanicza
pt. "PRP40 pośredniczy w komunikacji pomiędzy transkrypcją, splicingiem
i biogenezą miRNA"**

Architektura jądra komórkowego jest ściśle związana z przestrzenną organizacją ekspresji genów. Ujawnienie nielosowej lokalizacji makromolekuł jądrowych odsłoniło strukturalno-przestrzenną organizację tego procesu w komórce i doprowadziło do sformułowania idei domen jądrowych. Termin ten obejmuje nie tylko występowanie kompartmentów jądrowych o określonej ultrastrukturze i składzie molekularnym ale także uwzględnia zachodzące pomiędzy nimi wzajemne relacje przestrzenne i funkcjonalne. Najwcześniej i najlepiej poznanym związkiem *loci* genomowych z domenami zawierającymi elementy maszynierii transkrypcyjnej i dojrzewania RNA jest jąderko. W strukturze tej kolejne etapy biogenezy rRNA zachodzą w dokładnie zdefiniowanych subdomenach jąderkowych (centra fibrylarne, gęsty składnik fibrylarny i składnik granularny), co zapewnia efektywną i kontrolowaną ekspresję genów rDNA. Znane są także domeny jądrowe, które są ubogie w DNA a ich funkcję wiąże się z modyfikacją czy magazynowaniem czynników biorących udział w jądrowym metabolizmie. Przykładem takich struktur są skupiska ziarnistości interchromatynowych czy ciała jądrowe. Ze względu na poznawanie coraz to nowych czynników zaangażowanych w proces ekspresji genów oraz ujawnianiu nowych mechanizmów regulacji tych zjawisk badania nad funkcjonalną organizacją jądra komórkowego stanowią ważny i bardzo aktualny obszar badań.

Przedstawiona do oceny praca doktorska dotyczy związku pomiędzy transkrypcją i dojrzewaniem miRNA ze szczególnym uwzględnieniem roli białka PRP40. Pracę wykonano w Zakładzie Ekspresji Genów UAM, w zespole prof. Z. Szweykowskiej-Kulińskiej i prof. A. Jarmołowskiego, w jednostce prezentującej wysoki poziom naukowy i będącej jednym z liderów w badaniach nad molekularnymi mechanizmami



potranskrypcyjnego wyciszania genów z udziałem miRNA. Praca podejmuje aktualny temat biogenezy miRNA, w tym przypadku także, w kontekście funkcjonalnej architektury jądra komórkowego u roślin. Jest przykładem niezwykle efektywnej kompilacji badań molekularnych z analizą *in situ*, umożliwiającą pełne poznanie zjawisk zachodzących w komórce.

Dysertacja ma formę monografii, posiada typowy układ dla prac badawczych i spełnia wszystkie wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim. Praca obejmuje 125 stron druku, 59 rycin, z czego większość stanowią zdjęcia z mikroskopu konfokalnego oraz wykresy i tabele. W dyskusji ponadto znajdują się cztery schematy podsumowujące wyniki badań. W całej pracy zacytowano 203 pozycji literatury. Recenzowana dysertacja została napisana starannie i przejrzysto.

Wstęp pracy jest bardzo dobrym wprowadzeniem w przedmiot badań. Znajdziemy tam, zebrane w sposób niezwykle klarowny a jednocześnie opisujący najnowsze doniesienia, informacje dotyczące biogenezy miRNA, ze szczególnym uwzględnieniem różnic w tych procesach pomiędzy roślinami i zwierzętami. Następnie Doktorant opisał funkcje i skład mikroprocesora wskazując również na udział występujących w nim białek w innych, niż biogeneza miRNA procesach jądrowych. Szczególnie interesujący według mnie jest rozdział dotyczący powiązania procesów transkrypcji i dojrzewania RNA. Zjawisko to jest znane w przypadku genów kodujących mRNA i wykazano, że większość etapów dojrzewania transkryptów zachodzi już w trakcie ich syntezy. Istotną rolę odgrywa w tym procesie domena CTD polimerazy II RNA (POL II RNA) stanowiąca swoistą platformę dla wielu czynników niezbędnych do obróbki mRNA. Zmiany w fosforylacji aminokwasów wchodzących w skład C-terminalnej domeny POL II RNA zmieniają powinowactwo do białek dostarczając w odpowiednim momencie transkrypcji czynników do dojrzewania mRNA. Na związek pomiędzy tymi procesami wskazuje także obecność czynników transkrypcyjnych występujących w spliceosomie. Jednakże jak dotąd nie wiadomo czy podobne mechanizmy występują w przypadku biogenezy pri-miRNA w komórkach roślin. We wstępie znajdziemy kilka przesłanek wskazujących na możliwość asocjacji białek związanych z dojrzewaniem i transkrypcją pri-miRNA. Szeroko jest także omawiana rola PRP40 jako białka związanego zarówno z maszyną syntezy RNA ale również z U1 snRNP, czy białkami CBC. Na uwagę zasługuje fakt, że wiele z tych doniesień pochodzi z jednostki w której mgr Gulanicz prowadził badania, co wskazuje, że recenzowana dysertacja jest kontynuacją badań prowadzonych z powodzeniem od wielu lat. Całość tego rozdziału doskonale tłumaczy zasadność postawienia celu badawczego rozprawy doktorskiej jakim było: poznanie roli białka PRP40 w koordynacji transkrypcji, splicingu i biogenezy miRNA u roślin.



W pierwszej części rozdziału Wyniki przedstawiono dane uzyskane z zastosowaniem technik immunocytochemicznych, FISH oraz pomiarów stopnia kolokalizacji analizowanych antygenów w jądrach liści *A. thaliana* typu wt oraz szeregu mutantów. Pozwoliło to nie tylko, jak w typowych metodach immunoprecypitacyjnych określić sieć połączeń pomiędzy badanymi antygenami ale także ujawnić miejsce ich asocjacji w jądrze komórkowym oraz oszacować jaka część z analizowanych molekuł występuje poza analizowanym kompleksem. Dodatkowo zastosowanie przeciwciał do różnych form POL II RNA umożliwiło badania sekwencji zdarzeń, takich jak występowanie czynników poza kompleksem transkrypcyjnym, montaż tego kompleksu a także transkrypcję genów. Wraz z zastosowaniem solidnych analiz statystycznych w mojej ocenie przyjęta metodologia jest właściwa do realizacji planowanych zadań. Pozwoliło to na uzyskanie oryginalnych i bardzo interesujących wyników dotyczących koordynacji biogenezy transkryptów syntetyzowanych przez POL II RNA. Już wstępne wyniki wykazały po raz pierwszy, że PRP40 nie jest typowym białkiem U1snRNP, ponieważ wykazuje niski poziom asocjacji z U1 snRNA a jednocześnie, że jego rola w współorganizacji kompleksu transkrypcyjnego jest uzależniona od stopnia montażu kompleksu transkrypcyjnego. Wykazano także, że pewna pula białka Serrate jest powiązana z POL II RNA poprzez PRP40, szczególnie podczas inicjacji transkrypcji. Jednak stopień tych kolokalizacji z POL II RNA był częściowy, co sugeruje, że znaczna część analizowanych antygenów występowała poza kompleksem transkrypcyjnym. Stąd moje pierwsze pytanie: jakie jest prawdopodobieństwo występowania tej części badanych białek w speckles, znanych z obserwacji w mikroskopie elektronowym jako skupisko ziarnistości interchromatynowych? Proszę również opisać i porównać jaką funkcję pełnią te struktury w jądrze komórkowym u roślin i zwierząt.

Następne eksperymenty zmierzały do wyjaśnienia, czy dobrze udokumentowane zjawisko kotranskrypcyjnego dojrzewania, w tym splicingu mRNA, występuje także w przypadku genów MIR. Ponieważ oba typy transkryptów są generowane przez polimerazę II RNA zachodzenie takiego powiązania wydawało się jak najbardziej prawdopodobne. Dokładne poznanie tych mechanizmów jest tym bardziej interesujące, że fragmentaryczne dane sugerują na rozdzielenie miejsc powstawania i obróbki miRNA. Szereg, niezwykle przemyślanych i eleganckich eksperymentów w niniejszej rozprawie doktorskiej doprowadziło do sformułowania modelu wyjaśniającego wzajemne relacje pomiędzy czynnikami zaangażowanymi w transkrypcję i dojrzewanie pri-miRNA. Wykazano rolę PRP40 w montażu kompleksu transkrypcyjnego obsługującego geny MIR. PRP40 łączy się z POL II RNA ale także białkiem Serrate, które to asocjuje z CBC, DCL1, czy U1snRNP prawdopodobnie w przypadku kiedy pri-miRNA zawiera introny. Wskazuje to na udział PRP40 w kotranskrypcyjnym montażu elementów mikroprocesora. Niezwykle interesującym według mnie dodatkowym wnioskiem wynikającym



z opisanego modelu jest istnienie prawdopodobnie dwóch pul, odmiennych funkcjonalnie form białka HYL1. Jedna z nich związana jest bezpośrednio z POL II RNA a druga z białkiem Serrate zaangażowana jest w dojrzewanie pri-miRNA. W dyskusji Doktorant sugeruje, że różna funkcja białka HYL1 może być związana z odmiennym poziomem fosforylacji. Ta hipoteza jest niezwykle interesująca, ponieważ wykazano, że zmiana poziomu fosforylacji HYL1 po przez wyciszenie genu fosfatazy CPL1 wpływa na zmianę lokalizacji tego białka w jądrze komórkowym.

Chciałbym również dodać, że powyższe dane są bardzo przekonujące ponieważ zostały potwierdzone z zastawianiem nowoczesnej techniki PLA (Proximity ligation assay) umożliwiającej precyzyjną lokalizację miejsc asocjacji dwóch badanych antygenów w komórkach utrwalonych. Jednocześnie analizując dokumentację fotograficzną zauważyłem różną ilość sygnału w przypadku badanych par białek. W mojej ocenie najwięcej skupisk było obecnych w przypadku białek AGO1:POL II RNA-S2-P, natomiast zdecydowanie mniej dla HYL1:Pol II-RNA-S5-P czy PRP40:POL II RNA-S5-P. Dlatego chciałbym zapytać Doktoranta, czy te dane można interpretować ilościowo, a jeśli tak, to co z nich wynika w prezentowanych badaniach? Również chciałbym się dowiedzieć dlaczego obserwowano różną wielkość skupisk sygnału uzyskanego techniką PLA.

Kolejne zagadnienie badane w pracy doktorskiej dotyczy funkcji Dicer bodies (DB) w metabolizmie miRNA. W pierwszym etapie badań mgr Tomasz Gulanicz dopracował technikę lokalizacji pri- i miRNA stosując sondy oligonukleotydowe oraz typu Stellaris. Uzyskał w ten sposób pionierskie wyniki dotyczące *in situ* detekcji poszczególnych fragmentów pri-miRNA takich jak introny, połączenia egzon/egzon po usunięciu intronu, czy fragmenty pętli. Niezależnie od tego do jakiego fragmentu pri-miRNA skierowane były sondy, w jądrach komórkowych obserwowano jedno bądź dwa wyraźne skupiska. Pozwoliło to wraz z jednoczesną lokalizacją nowopowstałych RNA na umiejscowienie w jądrze z dużym prawdopodobieństwem miejsc transkrypcji genów MIR. Wyniki kolokalizacji elementów mikroprocesora z aktywną transkrypcyjnie formą POL II RNA również potwierdzają powyższą ideę. W dalszej części Doktorant wykazał, że miejsca te nie kolokalizują z wyznaczonymi przez przeciwciała do HYL1 i DCL1 ciałami D. Wyniki te są interesujące i zmieniają dotychczasową funkcję DB. Jednakże chciałbym zapytać o sposób detekcji DB. Dotychczas najczęściej w tym celu stosowano linię HYL1-YFP *A. thaliana* wygenerowaną w laboratorium prof. Fanga. Fluorescencja w tych roślinach występuje w postaci homogennej w całym jądrze komórkowym z jednoczesną obecnością skupisk uważanych jako ciała D. Struktury te występują zazwyczaj jako pojedyncze, przyjąderkowe w ok. 70% komórek. Jestem ciekawy jak Doktorant interpretuje różnice w lokalizacji pomiędzy wyżej wymienioną linią *A. thaliana* a stosowanymi w swojej pracy przeciwciałami skierowanymi przeciwko



DCL1 i HYL1 oraz jakie wykonano eksperymenty kontrolne sprawdzające ich specyficzność.

Następne eksperymenty Doktoranta zmierzały do ustalenia funkcji DB. Obserwowano znacznie częstsze występowanie DCL1 w D-bodies w mutantach *prp40* oraz *se-2*. Wskazuje to, że obniżony poziom PRP40, powodujący zaburzenia w montażu kompleksu transkrypcyjnego sprzyja gromadzeniu się DCL1 oraz HYL1 w DB. Wykazano jednocześnie, że u tych mutantów następuje wzrost całkowitej ilości analizowanych dwóch białek. Doktorant szeroko omawia otrzymane wyniki w dyskusji, podając więcej przykładów wpływu intensywności transkrypcji genów MIR na ilość i naturę DB. Całość jest podsumowana bardzo dobrym schematem w dyskusji wskazującym, że DB pełnią funkcję magazynu dla białek biorących udział w transkrypcji i dojrzewaniu miRNA oraz mogą być zaangażowane we wstępne etapy składania mikroprocesora. W mojej ocenie jest to bardzo atrakcyjna hipoteza mocno udowodniona wieloma doświadczeniami w ocenianej pracy, tym bardziej, że podobne mechanizmy występują w przypadku ekspresji genów kodujących białka. W wyniku zaburzeń czy zahamowania transkrypcji lub splicingu mRNA, czynniki obsługujące te procesy są odłączane od chromatyny i magazynowane w licznych speckles, które ulegają powiększeniu i są miejscem magazynowania nieaktywnych białek. Jednakże w przypadku miRNA, DB są pojedyncze i są strukturami o niewielkich rozmiarach, dlatego proszę Doktoranta o porównanie obu tych modeli. Interesuje mnie także dlaczego na zdjęciach po zastosowaniu α -amanityny poziom sygnału po detekcji DCL1 i HYL1 wydaje się niższy. Czy w tym przypadku może dochodzić do degradacji białek związanych z biogenezą miRNA?

Podsumowując część naukową dysertacji, przedstawione wyniki znacznie przyczyniły się do pełniejszego zrozumienia roli białka PRP40 w powiązaniu procesów transkrypcji i obórki pri-miRNA. Wyniki dotyczące miejsc syntezy i przestrzennej organizacji ekspresji genów MIR są nowatorskie i wytyczają nowe hipotezy i mechanizmy. Dyskusja otrzymanych wyników jest przeprowadzona prawidłowo, w oparciu o najnowszą literaturę przedmiotu a sformułowane wnioski są adekwatne do uzyskanych wyników i w pełni uzasadnione. W mojej ocenie Doktorant w pełni zrealizował postawione na początku pracy cele i zadania badawcze. Na podkreślenie zasługuje także wysokiej jakości dokumentacja fotograficzna oraz dobrze i starannie napisany tekst rozprawy. Wszystkie przedstawione w recenzji pytania i sugestie w żadnym stopniu nie wpływają na jak najbardziej pozytywną ocenę całej pracy doktorskiej a ich zadaniem jest stworzenie przestrzeni do dyskusji.

Podsumowując stwierdzam, że dysertacja doktorska Pana mgr Tomasza Gulanicza spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskimi i wnioskuję do Rady



Naukowej w dyscyplinie Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego. W moim przekonaniu praca doktorska prezentuje wysoki poziom naukowy, szczególnie doceniam ambitne cele pracy, zastosowane metody a także wartościowe wyniki, które otwierają szerokie perspektywy badawcze. Biorąc pod uwagę wszystkie te aspekty wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pana mgr Tomasza Gulanicza stosowną nagrodą.