

Prof. dr hab. Jadwiga Jaruzelska  
ul. Strzeszyńska 32  
60-479 Poznań  
e-mail:  
jadwiga.jaruzelska@igcz.p  
oznan.pl  
www.igcz.poznan.pl

### **Recenzja rozprawy doktorskiej**

**pt. " Molekularne oddziaływania pomiędzy białkami maszynerii splicingowej  
i poliadenylacji roślin "**

**Dla:** Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne  
Uniwersytetu Im. Adama Mickiewicza

**Doktorant:** Pan mgr Łukasz Szewc

Pan mgr Łukasz Szewc przygotował rozprawę doktorską pod kierunkiem prof. dr hab. Artura Jarmołowskiego cieszącego się międzynarodowym uznaniem wybitnego znawcy procesu splicingu. Punktem wyjścia rozprawy były doniesienia pochodzące z jego laboratorium, o tym że zablokowanie wiązania cząstki U1snRNP z prekursorami miRNA u roślin skutkuje ich przedwczesną poliadenylacją. Skoro mechanizm odpowiedzialny za blokowanie przedwczesnej poliadenylacji przez U1snRNP u roślin nie został poznany, analiza tej roli U1snRNP w powiązaniu z mechanizmem poliadenylacji stała się głównym celem tej rozprawy a badania wykonano w oparciu o model *Arabidopsis thaliana*. Wstęp rozprawy jest bardzo ciekawy i przeczytałam go z dużym zainteresowaniem. W logiczny i klarowny sposób przekonuje o słuszności oraz ciężarze gatunkowym celu badawczego. Jest zwarty bo pozbawiony dłużyżn. Szczególnie doceniłam Rycinę 5 w której pokazano uderzającą homologię kompleksu poliadenylacyjnego pomiędzy człowiekiem, drożdżami a roślinami.

Biorąc pod uwagę ogrom zamieszczonych wyników ograniczam się do komentowania tylko niektórych. Pierwszym etapem badań była identyfikacja białek wchodzących w interakcję z cząstką U1snRNP, by sprawdzić czy jest fizycznie powiązana z maszyną poliadenylacyjną. W tym celu przy pomocy przeciwciał w stosunku do białek specyficznych dla U1snRNP, a mianowicie U1-70K oraz PRP40B, przeprowadzono immunoprecypitację a następnie

spektrometrię mas by zidentyfikować białka które występowały w kompleksie z nimi. Dużym sukcesem tego etapu badań było wykrycie, wśród interaktorów białek specyficznych dla U1snRNP, białek biorących udział w splicingu oraz poliadenylacji. Jednak na str.72 w opisie koimmunoprecypitacji, w przypadku co-IP przeciwciałem anti-U1-70K brakuje mi doprecyzowania kontroli negatywnej. Autor tłumaczy, że mutant tego białka był letalny i stąd kontrola negatywna polegała na „niedodaniu przeciwciała”. To zbyt ogólne sformułowanie. Ponadto co to znaczy - „dokonano oceny wzbogacenia białek w próbie badanej względem próby kontrolnej” oraz następane zdania dotyczące tej kwestii? Jakie znaczenie ma ocena istotności statystycznej oddziaływań skoro białka o interakcji statystycznie nieistotnej były wybrane do dalszych badań? Wśród nich były białka kompleksu poliadenylacyjnego tzn., dwa białka wchodzące w interakcję z oboma białkami, U1-70K oraz PRP40B cząstki U1snRNP, mianowicie AtCFI25 oraz AtCF68, homologi składników ludzkiego kompleksu CFI<sub>m</sub>, odpowiednio CFI25<sub>m</sub> oraz CFI68<sub>m</sub>.

W następnym kroku sprawdzano czy białko AtCFI25 oddziałuje z AtCFI68. Zastosowanie konstrukcji fuzyjnych z GFP pokazało po pierwsze, lokalizację obu białek w jądrze komórkowym protoplastów *Arabidopsis*, choć niewielka ilość AtCFI25 była obecna również w cytoplazmie. Po drugie, zastosowanie techniki FRET-FLIM pokazało kolokalizację oraz oddziaływanie AtCFI68 z AtCFI25, w przeciwieństwie do dwóch kontrolnych białek jądrowych, co do których wiadomo, że kompleksów nie tworzą. To doświadczenie pozwoliło to wyciągnąć wniosek o występowaniu w jądrze komórkowym kompleksu CFI zbudowanego z tych dwóch podjednostek, CFI25 i CFI68.

Jednak w kompleksie brakowało homologa trzeciego składnika ludzkiego kompleksu CFI a mianowicie białka CFI<sub>m</sub>59. By stwierdzić czy taki homolog występuje u *Arabidopsis*, zastosowano linię transgeniczną w której białko AtCFI25 w fuzji z EGFP wprowadzono do mutantu pozbawionego jego endogennej ekspresji. Mutant charakteryzował się nieprawidłowościami co wskazywało na ważność białka AtCFI25. Nasuwa się pytanie, czy badano ewentualne przywrócenie fenotypu dzikiego pod wpływem wyżej wymienionego transgeny? Koimmunoprecypitacja przeciwciałem anti-EGFP potwierdziła uprzednio wykrytą interakcję AtCFI25 z białkiem AtCFI68 oraz pozwoliła wykryć nowe białko, homolog ludzkiego CFI<sub>m</sub>59, które nazwano AtCFI59. W immunoprecypitacji zidentyfikowano także kilka innych białek, np. białka wiążące się z poli(A) oraz helikazy typu DEAD-box. Ponowne zastosowanie techniki FRET-FLIM uwidocznili bezpośrednią interakcję pomiędzy nowo wykrytym AtCFI59 a białkiem AtCFI25, co dowodzi że stawi ono trzecią podjednostkę roślinnego kompleksu CFI.

Ponadto wśród białek koimmunoprecypitujących z AtCFI25 wykryto także AtFIPS5 którego interakcja z AtCFI25 została już wcześniej opisana u roślin. Następnie, zastosowanie FRET-FLIM pokazało bezpośrednie oddziaływanie białka AtFIPS5 z białkiem AtCFI25 stanowiącym kluczową podjednostkę CFI oraz brak oddziaływania z AtCFI59 oraz AtCFI68. W tytule Tabeli 1 str.78 występuje nazwa AtSFIS2. Rozumiem, że chodzi o białko AtCFI25? Stosowanie synonimów w rozprawie zawierającej nazwy bardzo wielu białek utrudnia podążanie za tekstem.

By dowiedzieć się na temat roli zidentyfikowanych homologów białek ludzkiego kompleksu CFIm: AtCFI25, AtCFI59, AtCFI68, FIPS5 oraz CFIS1 (wyboru tego ostatniego białka w tym miejscu rozprawy nie uzasadniono, być może również tutaj chodziło o synonim jakiegoś białka wspomnianego wyżej) zastosowano mutanty uzyskane poprzez insercję T-DNA wewnątrz genów kodujących te białka. Bardzo starannie uzasadniono kryteria wyboru tych mutantów, w tym miejsce lokalizacji insercji, by upewnić się że mutanty są całkowicie pozbawione ekspresji badanych białek. Mutant AtCFI25 wykazywał szereg nieprawidłowości fenotypowych. W przypadku CFIS1 nie stwierdzono nieprawidłowości fenotypowych, co wskazywało na nieistotną rolę tego elementu kompleksu CFI. Zastosowanie podwójnego mutantu, czyli dodatkowo *cfi25* pokazało taki sam fenotyp jak samego mutantu *cfi25*, co dodatkowo potwierdziło, że CFIS1 nie był istotny dla fizjologii *A. thaliana*. Również mutant genu *AtSF159* nie wykazywał nieprawidłowego fenotypu tudzież mutant *AtSF168*. Wskazywało to na funkcjonalne pokrywanie się białek AtSF159 i AtSF168. Analiza podwójnego mutantu pod względem genów kodujących te białka potwierdziła to przypuszczenie ponieważ jedynie ów podwójny mutant wykazywał szereg nieprawidłowości. Z kolei ani u mutantu genu *AtFIPS5* ani dołączonego do badań dodatkowej wersji białka FIPS, tzn. *AtFIPS3* nieprawidłowości fenotypowe nie występowały. Dopiero podwójny mutant pod względem tych dwóch genów pokazał nieprawidłowości, jednak znacznie słabsze w porównaniu z mutantami poprzednimi (np. brak problemu z plennością). Wskazywałoby to że białka te funkcjonalnie pokrywają się. Jednak brak takiego wniosku w tym miejscu wyników str 91. Warto zaznaczyć, że wszystkie podwójne mutanty były przygotowane przez Doktoranta.

W dalszym etapie, dla pełniejszego obrazu kompleksu poliadenylującego zidentyfikowano białka oddziałujące z każdym zidentyfikowanym wyżej białkiem kompleksu CFI (AtCFI25, AtCFI59, AtCFI68 oraz AtCFIPS5). Wygenerowano w tym celu po dwie linie transgeniczne. W każdej parze dane białko w fuzji z GFP występowało w tle uprzednio analizowanego odpowiadającego mu mutantu insercyjnego. Po dokładnym skontrolowaniu

całego układu wykonano koimmunoprecypitację dla każdego z czterech białek i dla każdego uzyskano białka o rozlicznych funkcjach. Znaczną liczbę stanowiły białka związane ze splicingiem, szczególnie w powiązaniu z białkiem AtCFI68.

Wyizolowano również białko AtSFIS1 charakteryzujące się homologią z ludzkim białkiem CFIm25, które choć mniej podobne do ludzkiego białka CFIm25, oddziałuje z białkami AtCFI59, AtCFI68 oraz FIPS5, co pokazano techniką FRET-FLIM. Interesujące, że białko AtSFIS1 występuje głównie w nasionach w porównaniu z AtCFI25 występującym powszechnie. Pokazuje to że pewne elementy kompleksu CFI mogą być specyficzne dla danej fazy rozwoju rośliny.

Następnym ważnym etapem było sprawdzenie czy białko U1-70K cząstki U1snRNP kolokalizuje z białkami AtCFI25, AtSFIS1 i AtSFIS2 w jądrze komórkowym protoplastów *Arabidopsis*. W opisie wyniku zamieszczonego w Rycinie 40, str. 102, Autor stwierdza brak kolokalizacji U1-70K z każdym z tych białek. Nie jestem przekonana co do takiej negatywnej interpretacji śledząc tego typu doświadczenia oraz ich interpretację w różnych artykułach. Powiedziałbym, że białka AtCFI59 oraz AtCFI68 kolokalizują z AtU1-70K, przynajmniej częściowo - kolor żółty jest bardzo wyraźny w przypadku tych białek, choć nie dotyczy białka AtCFI25. Czy Autor uważa, że jedynie całkowity zanik koloru czerwonego i zielonego w nałożonym obrazie świadczyłby o kolokalizacji danej pary białek? Niestety brak kontroli negatywnej w tym doświadczeniu nie ułatwia oceny tego wyniku.

Dalsza część rozprawy koncentrowała się nad powiązaniem białek wykrytego kompleksu CFI z poliadenylacją. Po pierwsze skorzystano z opublikowanych danych opisujących wzory poliadenylacji u *Arabidopsis* pochodzące z bezpośredniego sekwencjonowania RNA techniką Direct RNA Sequencing. Wybrano losowo 9 genów dla których wykonano analizy 3'RACE w roślinach typu dzikiego i w mutantach CFI (*cfi-25-1*, *cfis1-1* oraz *cfi68-1*) oraz to samo dla genu prekursora miRNA163. Zmiany wzorów poliadenylacji intronowej zaobserwowano dla 5 spośród 9 wybranych genów. Występowały jedynie u mutantów *cfi25-1*, co wskazuje na jego istotną rolę w wyborze miejsca poliadenylacji. W tym ostatnim przypadku wydajność poliadenylacji intronowej była obniżona lub dodatkowo pojawił się nowy sygnał poliadenylacji.

Z kolei, by sprawdzić wpływ mutantów powyższych białek kompleksu CFI na splicing, przeprowadzono RT-PCR na tym samym materiale co uprzednie doświadczenie 3'RACE i pokazano zmiany we wzorze produktów splicingu w porównaniu z roślinami dzikimi, lecz jedynie w przypadku białka CFI25-1. Obserwowana zmiana polegała na zmniejszeniu poziomu

prekursora zawierającego intron dla czterech spośród dziesięciu przebadanych genów. Nasuwa się pytanie, jaka mogła być przyczyna braku zmian w pozostałych przypadkach?

Następny etap badań dotyczył m. in. zaangażowania kompleksu CFI w splicing w wymiarze globalnym poprzez zastosowanie analizy transkryptomu mutantów kompleksu CFI oraz białek FIPS. Uzyskane wyniki zostały przedstawione w Rycinie 46 która jest dla nich kluczowa. Niestety zawiera szereg niejasności. Np. brak informacji co oznaczają wariant 1 i wariant 2 – warianty pod jakim względem? Może chodziło o wyżej wspomniane po dwie równoległe linie transgeniczne dla każdego białka kompleksu CFI? Bez tej podstawowej informacji trudno te wyniki analizować. W rycinie pokazano trzy typy analizy: DE, DAS oraz DTU. W przypadku DAS co oznacza „zmiana poziomu genu”. Z kolei bardzo interesującym wątkiem tej części jest wykrycie w podwójnych mutantach *cfi25/cfis1*, *cfi59/68* oraz w mniejszym stopniu w podwójnym mutancie *fips3/fips5* zjawiska nieprawidłowej terminacji transkrypcji. Polegała na nierozpoznaneniu miejsc poliadenylacji na końcu genu, które skutkowało brakiem cięcia i poliadenylacji a zatem kontynuacją transkrypcji. W rezultacie może dochodzić do jednoczesnej transkrypcji dwóch blisko sąsiadujących genów. Wyniki te zostały potwierdzone analizą RT-PCR. Ciekawe jak przebiega w komórce obróbka tego typu chimerycznych transkryptów i jakie są ich losy?

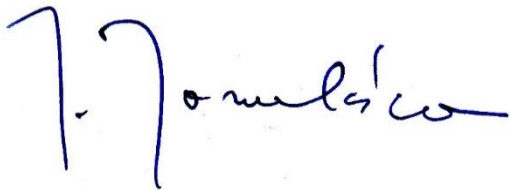
Dyskusja wyników rzeczowa, interesująca i wielowątkowa, co wynika między innymi z bogactwa uzyskanych wyników.

W sumie Pan mgr Łukasz Szewc pokazał strukturę roślinnego kompleksu AtCFI oraz jego bardzo liczne białkowe interakторы oraz interakcje w obrębie jądra komórkowego. Pokazał powiązanie AtCFI poprzez białko AtFIPS5 z maszyną poliadenylacyjną. Kluczowym odkryciem było pokazanie zaangażowania kompleksu AtCFI w proces przedwczesnej poliadenylacji a przede wszystkim powiązania z U1snRNP z procesem teleskryptingu. Równie ważne jest pokazanie zaangażowania AtCFI w kontrolowanie terminacji transkrypcji cząsteczek mRNA. Zastosowanie odpowiednich mutantów pokazało, że defekt tego mechanizmu skutkuje powstawaniem transkryptów chimerycznych składających się z więcej niż jednego transkryptu, jeśli sąsiednie geny występują w bliskim sąsiedztwie.

### **Wniosek końcowy**

Rozprawę Pana mgr Łukasza Szewca przeczytałam z dużym zainteresowaniem. Dostarcza wielu cennych nowych wyników dotyczących powiązania splicingu, poliadenylacji, w tym

alternatywnej poliadenylacji oraz terminacji transkrypcji. Doktorant dokonał tego w oparciu o najbardziej nowoczesną metodologię. Rozprawa jest to dla mnie szczególnie cenna biorąc pod uwagę, podobieństwo tych procesów pomiędzy rośliną a człowiekiem. Poza wartościowymi wynikami rozprawa pokazuje niezwykle ciekawą perspektywę dalszych badań. Dlatego uważam ją za niezwykle wartościową i całkowicie spełniającą formalne warunki stawiane rozprawom doktorskim. Wobec tego wnioskuję o dopuszczenie Pana mgr Łukasza Szewca do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę wysoką wartość wyników, ich interpretacji oraz niezwykle staranność opisu wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza o wyróżnienie rozprawy.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "J. Jomelska". The signature is written in a cursive style with a large initial "J" and a long horizontal stroke at the end.