

POLSKA AKADEMIA NAUK



Profesor Włodzimierz Krzyżosiak

INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ

ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań

tel.: centrala 61 852 85 03, sekretariat 61 852 89 19

fax: 61 852 05 32, e-mail: ibch@ibch.poznan.pl

REGON 000849327

NIP 777-00-02-062

Poznań, 14 kwietnia 2017 r

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Agaty Stępień

pt. „Analiza zależności między maszyną biogenezy mikroRNA a spliceosomem u roślin”

wykonanej w Zakładzie Ekspresji Genów Wydziału Biologii UAM w Poznaniu

napisanej pod kierunkiem prof. dr hab. Przemysława Wojtaszka

Badania przedstawione w ocenianej rozprawie doktorskiej wpisują się w nurt szeroko zakrojonych prac badawczych prowadzonych w Zakładzie Ekspresji Genów WB UAM, dotyczących funkcjonalnych powiązań między procesem biogenezy roślinnych mikroRNA i poszczególnymi etapami procesu ekspresji roślinnych genów, głównie procesem splicingu.

Wyniki wcześniejszych prac wykonanych w tym zakładzie oraz w innych zespołach badawczych wskazywały na możliwość zachodzenia bezpośrednich oddziaływań pomiędzy elementami systemów odpowiedzialnych za biogenezę cząsteczek mikroRNA oraz wycinanie intronów występujących w ich prekursorach. Niewiele było jednak wiadomo o białkach zaangażowanych w te oddziaływania i o naturze tych interakcji.

Celem pracy doktorskiej mgr Agaty Stępień było zatem poszerzenie i pogłębienie tej wiedzy, a w szczególności weryfikacja hipotezy, że roślinne białko SERRATE (SE) pełni rolę kluczowego molekularnego łącznika pomiędzy maszyną biogenezy mikroRNA i maszyną splicingu. Hipoteza ta zakładała, że nieznanymi dotąd splicingowymi interaktorami białka SE należy szukać wśród składników U1 snRNP ze względu na jego oddziaływanie z miejscem donorowym intronu, którego wycinanie, jak wcześniej stwierdzono, jest funkcjonalnie powiązane z dojrzewaniem pri-miRNA.

Autorka postanowiła osiągnąć ten cel poprzez realizację następujących szczegółowych zadań:

- pogłębienie wiedzy na temat oddziaływań białka SE z roślinnym kompleksem AtCBC wiążącym strukturę czapeczki
- zbadanie, które białkowe składniki snRNP U1 są zdolne do bezpośredniego wiązania się z białkiem SE
- bardziej szczegółowe scharakteryzowanie oddziaływań SE z tymi białkami
- zbadanie wpływu oddziaływań SE z U1 snRNP na biogenezę mikroRNA

Realizując pierwsze z tych zadań Autorka wykorzystała najpierw technikę mikroskopową BiFC do lepszego poznania natury oddziaływań SE z AtCBC i wykazała zdolność białka SE do specyficznego oddziaływania z obydwoma podjednostkami AtCBP20 i AtCBP80 kompleksu wiążącego czapeczkę w komórce roślinnej. Następnie wykorzystała technikę *pull down* aby zidentyfikować fragment SE zaangażowany w to oddziaływanie. Zaprojektowała w tym celu odpowiednie konstrukcje genowe, przeprowadziła nadprodukcję fragmentów białka SE w fuzji ze znacznikiem w komórkach *E. coli* i użyła frakcję rozpuszczalną białka do eksperymentów *pull down* wraz z odpowiednio wyznakowanymi podjednostkami kompleksu AtCBC otrzymanymi na drodze translacji *in vitro*. Wykazała, że do związania każdej z podjednostek AtCBC wystarcza ustrukturyzowany rdzeń białka SE. Zaobserwowała ponadto, że AtCBP20 wiąże się wydajniej do SE oraz, że wiązanie obu podjednostek łącznie jest silniejsze niż wiązanie każdej osobno, co sugerowało prawdopodobne tworzenie się kompleksu trójskładnikowego.

Pionierski charakter miały badania zmierzające do realizacji kolejnego zadania jakim była identyfikacja składników U1 snRNP oddziałujących z SE. Mgr Agata Stępień wykorzystała w tym celu najpierw drożdżowy system dwuhybrydowy i wykazała bezpośrednie oddziaływanie SE z czterema pomocniczymi składnikami U1 snRNP: AtPRP39b, AtPRP40a, AtPRP40b i AtLUC7rl. Następnie, stosując technikę *pull down* potwierdziła występowanie tych oddziaływań z całym białkiem SE. W kolejnym kroku wykorzystała metodę mikroskopową do zbadania lokalizacji komórkowej białek SE oraz czterech komponentów U1 snRNP w transfekowanych protoplastach. Zoptymalizowała układ eksperymentalny i stwierdziła, że białka te, chociaż wszystkie mają lokalizację jądrową i kolokalizują ze sobą, nie są zlokalizowane w ciałkach Cajala. Stosując metodę FRET-FLIM wykazała, że oddziaływanie SE z każdym z czterech badanych białek ma charakter bezpośredni, a ponowne wykorzystanie drożdżowego systemu dwuhybrydowego pozwoliło Autorce zidentyfikować fragment białka SE zaangażowany w te oddziaływania. Ponadto, mgr Agata Stępień wykazała, stosując odpowiednio dobrany układ eksperymentalny, że do oddziaływań białek pomocniczych U1 snRNP z SE dochodzi w obecności podstawowych białek tego kompleksu. Dowiodła tego stosując kombinację metod BiFC oraz FRET-FLIP po transfekcji protoplastów *A. thaliana* konstruktami SE, AtPRP40b i AtU1A.

W ostatnim etapie prac doświadczalnych opisanych w rozprawie doktorskiej Autorka badała rolę oddziaływań SE z snRNP U1 w biogenezie mikroRNA z wykorzystaniem dostępnych mutantów SE *A. thaliana* zaburzających strukturę tego białka w jego końcu karboksylowym, a dokładniej w mutancie *se-1* z białkiem SE skróconym o 20AA i mutancie *se-2* z białkiem skróconym, jak wykazała, o kolejne 20AA. Stwierdziła jądrową lokalizację skróconych białek w formie charakterystycznych, ziarnistych skupisk i wykazała techniką FRET-FLIM, że w mutancie *se-2* doszło do utraty oddziaływań między SE i snRNP U1. Stwierdziła również, że w obu mutantach doszło do zaburzeń w biogenezie badanych mikroRNA. Niższy był poziom dojrzałego mikroRNA, a wyższy jego prekursora i efekt ten był większy dla mutantu *se-2*. Analizując proces dojrzewania miR1888a z prekursora zawierającego intron Autorka wykazała, że dochodzi do stymulacji jego biogenezy w linii, w której nie dochodzi do interakcji między SE i białkami snRNP U1.

Podsumowując, w ramach swojej pracy doktorskiej mgr Agata Stępień dostarczyła dowodów na bezpośrednie oddziaływanie białka SE z jednej strony z dwiema podjednostkami kompleksu wiążącego strukturę czapeczki, a z drugiej strony na również bezpośrednie oddziaływanie z czterema pomocniczymi składnikami kompleksu snRNP U1 zaangażowanego w proces splicingu u modelowej rośliny *A. thaliana*. Po stwierdzeniu tych oddziaływań scharakteryzowała je bardziej szczegółowo wykorzystując w tym celu zarówno metody biologii molekularnej jak i zaawansowane metody mikroskopowe.

Na podstawie uzyskanych wyników Autorka zaproponowała model przedstawiający sposób w jaki białka biogenezy mikroRNA oraz białka związane ze splicingiem przyłączają się do pierwotnego prekursora mikroRNA i komunikują się ze sobą za pośrednictwem białka SE odgrywającego kluczową rolę w tym procesie. Model ten ujmuję również wyniki uzyskane przez innych badaczy, a przedstawiająca go rycina 53 podobnie jak rycina 52 stanowią graficzne podsumowanie wyników tej pracy na tle dotychczas istniejącej wiedzy.

Oceniając pracę doktorską mgr Agaty Stępień od jej strony merytorycznej stwierdzam, iż jej wyniki stanowią bardzo znaczący krok naprzód w poznawaniu i rozumieniu natury sprzężeń występujących pomiędzy procesami biogenezy mikroRNA i splicingu u *A. thaliana*. Autorka zrealizowała postawione przed nią zadania w sposób konsekwentny i skuteczny, wykorzystując w tym celu szeroki i bardzo zróżnicowany nowoczesny warsztat badawczy.

W tym miejscu chciałbym zadać Autorce kilka pytań dotyczących spraw które wzbudziły moje zainteresowanie. Czym konkretnie Autorka tłumaczy efekty ziarnistości lub agregatowości sygnału mikroskopowego pochodzącego od różnie znakowanych białek? Co dokładnie przemawia za oddziaływaniem SE z białkami pomocniczymi U1 snRNP raczej oddzielnie, a nie łącznie? Czy Autorka rozważała użycie metody PLA (Proximity Ligation Assay) do badań relacji strukturalnych między oddziałującymi białkami?

Oceniając rozprawę doktorską od strony jej formy chciałbym odnotować jej tradycyjny układ, a także przejrzystość narracji oraz ilustracji. Redagując tę rozprawę Autorka nie ustrzegła się jednak drobnych uchybień w postaci nieskorygowanych błędów edytorskich. Niewłaściwe jest też użycie terminu „konformacja” w kontekście lokalizacji metki w strukturze białka.

Podsumowując wszystkie elementy tej recenzji uważam, że oceniana praca spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim i wnioskuję o dopuszczenie mgr Agaty Stępień do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, ze względu na duże znaczenie poznawcze bardzo dobrze opublikowanych wyników obejmujących wykazanie i strukturalne scharakteryzowanie funkcjonalnego związku pomiędzy maszyną splicingu i biogenezy mikroRNA, stawiam wniosek o wyróżnienie tej pracy doktorskiej.



Włodzimierz Krzyżosiak