



Instytut Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk

Dr hab. Edyta Kościńska
Zakład Biologii Integratywnej
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
Ul. Z. Noskowskiego 12/14, 61-740 Poznań

RECENZJA

**rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Brzęk
„Udział białka PC4 (Positive Cofactor 4) w regulacji ekspresji
zależnych od replikacji genów histonów w komórkach HeLa”.**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pani mgr Aleksandry Brzęk została wykonana pod kierunkiem pani dr hab. Katarzyny Doroty Raczyńskiej, a zrealizowana w Zakładzie Ekspresji Genów Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii, na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Badania wykonane w ramach pracy doktorskiej były wsparte finansowaniem z kilku grantów: Narodowego Centrum Nauki (UMO-2013/11/N/NZ1/00010 i UMO-2012/05/B/NZ2/00826), Grantu Dziekana Wydziału Biologii (GDWB-06/2017) oraz dotacji przyznanej Poznańskiemu Konsorcjum RNA (01/KNOW2/2014). Ponadto, analizę danych ChIP-seq wykonano w Poznańskim Centrum Superkomputerowo-Sieciowym (na podstawie grantu obliczeniowego nr 312).

W swojej pracy Doktorantka analizowała wpływ białka PC4 na poziom transkrypcji genów kodujących histony zależne od replikacji. W badaniach, w których wykorzystwała linię komórkową HeLa wykazała, że białko PC4 negatywnie reguluje proces transkrypcji badanych genów, przy czym jego działanie jest uzależnione od fazy cyklu komórkowego. W Zakładzie Ekspresji Genów na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu od wielu lat z dużym powodzeniem prowadzone są badania nad metabolizmem RNA oraz m.in. wpływem budowy chromatyny na przebieg transkrypcji prowadzonej przez polimerazę RNA II i sprzężony z nią splicing. Obiekt badań doktorantki, białko PC4, jest znanym koregulatorem transkrypcyjnym oraz czynnikiem uczestniczącym w terminacji transkrypcji poprzez oddziaływanie z białkiem CstF64 (składnikiem kompleksu cięcia i poliadenylacji oraz kompleksu cięcia transkryptów kodujących histony). Ponadto, badania wykonane w Zakładzie Ekspresji Genów UAM oraz w Zakładzie Biologii Komórki na Uniwersytecie Berneńskim w Szwajcarii pokazały, że białko PC4 oddziałuje z cząsteczką U7 snRNP biorącą udział w dojrzewaniu końca 3' transkryptów histonów zależnych od replikacji. Problematyka badawcza przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej wpisuje się więc w nurt interesujących i bardzo ważnych badań dotyczących regulacji ekspresji genów kodujących histony i znajduje głębokie uzasadnienie.

Ocena formalna i merytoryczna

Rozprawa doktorska pani Aleksandry Brzęk liczy 110 stron, zawiera 35 rycin, 7 tabel oraz 91 pozycji literaturowych. Praca została napisana w układzie tekstu typowym dla eksperymentalnych prac doktorskich z rozdziałami w następującej kolejności: tytuł pracy, spis treści, wykaz skrótów,

streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, cel pracy, materiały, metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie i wnioski, wykaz rysunków i tabel oraz spis literatury.

We WSTĘPIE do rozprawy Autorka na podstawie przeglądu danych literaturowych przedstawia wybrane zagadnienia związane z budową i funkcją histonów, regulacją ekspresji genów kodujących histony zależne od replikacji oraz dojrzewaniem końca 3' pre-mRNA takich histonów. Ponadto, szczegółowo charakteryzuje białko PC4. W końcowej części tego rozdziału Autorka przedstawia wyniki badań dotyczących oddziaływania białka PC4 z cząsteczką U7 snRNP oraz CstF64, które zostały wykonane w Zakładzie Ekspresji Genów. Na podstawie tych wyników wysuwa hipotezę, że białko PC4 może wpływać na poziom ekspresji genów kodujących histony zależne od replikacji nie tylko na poziomie transkrypcyjnym jako koregulator, ale również na poziomie kotranskrypcyjnym, poprzez oddziaływanie z białkiem CstF64 oraz cząstką U7 snRNP. Rozdział „Wstęp” został dobrze przygotowany, napisany jest ładnym językiem i jest bogato ilustrowany, co ułatwia zrozumienie tekstu. Przedstawione informacje opierają się na aktualnym stanie wiedzy i są przydatne do przeanalizowania wyników badań eksperymentalnych wykonanych przez Doktorantkę. Do tej części pracy mam dwa pytania. Autorka szczegółowo opisuje sposoby transkrypcyjnej i kotranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów kodujących histony zależne od replikacji. Ciekawi mnie czy coś wiadomo o możliwości potranskrypcyjnej regulacji ekspresji badanych genów, z uwagi na ich unikalną budowę. Drugie pytanie dotyczy zaprezentowanych, nieopublikowanych danych uzyskanych w Zakładzie Ekspresji Genów. Na rys. 10B (str. 29) Autorka prezentuje wynik analizy *western blot*, na podstawie którego twierdzi, że stan fosforylacji białka PC4 nie zmienia się w cyklu komórkowym. W mojej (wizualnej) ocenie poziom fosforylowanego PC4 w komórkach HeLa synchronizowanych do fazy S jest niższy, dlatego proszę o skomentowanie uzyskanego wyniku.

W drugiej części swojej rozprawy Doktorantka jasno i zwięźle nakreśla CELE PRACY. Z przeglądu literatury wynika, że do tej pory nie prowadzono badań nad wpływem białka PC4 na poziom ekspresji genów kodujących histony zależne od replikacji. Doktorantka stawia więc hipotezę, że białko PC4 może brać udział w regulacji ekspresji genów kodujących histony zależne od replikacji na poziomie transkrypcji, dzięki swojej aktywności jako koregulator transkrypcyjny, oraz na etapie dojrzewania końca 3' ich transkryptów, dzięki oddziaływaniu z białkiem CstF64 oraz cząstką U7 snRNP. W celu zweryfikowania postawionej hipotezy zaplanowała cztery zadania badawcze: (1) Analiza wpływu białka PC4 na poziom polimerazy RNA II związanej w obrębie genów kodujących histony zależne od replikacji; (2) Zweryfikowanie, czy białko PC4 wpływa na poziom transkryptów kodujących histony zależne od replikacji; (3) Zbadanie wpływu białka PC4 na proces dojrzewania końca 3' pre-mRNA kodujących histony zależne od replikacji; (4) Oszacowanie wpływu nadekspresji i wyciszenia ekspresji genu *PC4* na przebieg cyklu komórkowego.

W kolejnym rozdziale Autorka opisuje wykorzystane w pracy MATERIAŁY a następnie METODY. Warto podkreślić, że zaplanowane badania wykonane zostały z wykorzystaniem innowacyjnych metod eksperymentalnych, jak immunoprecypitacja chromatyny połączona z wysokoprzepustowym sekwencjonowaniem DNA (ChIP-seq) oraz zaawansowanych analiz bioinformatycznych. Realizacja badań wymagała także przygotowania nowych linii komórkowych i optymalizacji protokołów badawczych. Doktorantka dokładnie opisuje zastosowane procedury eksperymentalne, przy czym opis ten jest klarowny i wyczerpujący, co świadczy o jej dużej wiedzy w zakresie wykonywanych eksperymentów.

W zasadniczym rozdziale pracy (liczącym 33 strony) Doktorantka przedstawia WYNIKI swoich badań. W pierwszym etapie pracy, pani Aleksandra Brząk przygotowała trzy nowe linie komórkowe: linię komórkową HeLa wykazującą stabilną nadekspresję genu *PC4* (PC4 OE), linię z indukowanym wyciszeniem ekspresji genu *PC4* (PC4 KD) oraz linię kontrolną dla PC4 KD (HeLa *scramble*). Czwartą linię komórkową, którą wykorzystywała w swoich badaniach, tj. linię kontrolną dla komórek PC4 OE (HeLa EBFP OE ze stabilną nadekspresją genu wzmocnionej niebieskiej fluorescencji), uzyskała dzięki

uprzejmości badaczy z Uniwersytetu Berneńskiego. Komórki PC4 KD cechowały się indukowaną ekspresją cząsteczek shRNA, które ostatecznie, jako siRNA, naprowadzały kompleks RISC na transkrypt kodujący białko PC4. Poziom ekspresji cząsteczki shRNA był regulowany obecnością doksycykliny w pożywce. Komórki PC4 OE syntetyzowały białko selekcyjne dsRed2. Wszystkie linie komórkowe Doktorantka przygotowała metodą lentiwirusową. Do tej części pracy mam krótki komentarz i jedno pytanie. (1) W celu wytworzenia cząstek pseudowirusowych wykorzystane zostały komercyjnie dostępne plazmidy pomocnicze, natomiast sformułowanie Autorki „W celu zwiększenia bezpieczeństwa stosowania wektorów lentiwirusowych w laboratorium, elementy genomu lentiwirusa zostały podzielone pomiędzy trzy plazmidy” sugeruje, że przygotowała je samodzielnie. (2) Chciałabym wiedzieć na jakiej podstawie wybrano sekwencję wyciszającą transkrypt PC4 (shRNA), która została odpowiednio wklonowana do wektora pLKO-tet-on. Autorka wskazuje 3 programy, które wykorzystwała do zaprojektowania sekwencji shRNA, jednak nie komentuje wyboru odpowiedniej sekwencji.

W kolejnych eksperymentach wykonanych w ramach pracy doktorskiej Doktorantka określiła optymalny czas indukcji ekspresji sekwencji wyciszającej ekspresję genu *PC4*. Następnie, wyselekcjonowała pozytywnie zmodyfikowane linie komórkowe, zarówno PC4 KD jak i PC4 OE. W związku z tym, że użyte plazmidy zawierają różne geny selekcyjne chciałabym zapytać o wydajność transdukcji komórek HeLa przygotowanymi wektorami. Na Rys. 15 (str. 68) Autorka pokazuje komórki PC4 OE syntetyzujące białko selekcyjne – dsRed2, sfotografowane 36 godzin po transdukcji cząstką pseudowirusową. Nie pokazuje jednak analogicznego obrazu w świetle widzialnym ani zdjęcia zrobionego później, przy czym selekcja komórek na cytometrze wykonywana była po 60 godzinach od rozpoczęcia transdukcji.

Następnym etapem pracy była synchronizacja komórek HeLa z nadekspresją i wyciszeniem ekspresji genu *PC4* do fazy S i G1. Doktorantka w dużej mierze wykorzystwała stosowane protokoły, jednak w przypadku synchronizacji komórek PC4 KD i komórek kontrolnych musiała zoptymalizować szereg poszczególnych etapów protokołu synchronizacji, co wykonała z dużym sukcesem.

Kluczowym eksperymentem Doktorantki było sprawdzenie wpływu PC4 na poziom polimerazy związanej w obrębie genów kodujących histony zależne od replikacji oraz niezależne od replikacji. W tym celu wykonała ona immunoprecypitację chromatyny połączoną z wysokoprzepustowym sekwencjonowaniem DNA (ChIP-seq) w komórkach HeLa wykazujących nadekspresję genu *PC4* (PC4 OE) oraz w komórkach kontrolnych EBFP OE, zsynchronizowanych do fazy S i G1 cyklu komórkowego. W swojej analizie Doktorantka wykazała obniżenie poziomu RNAP2 w komórkach PC4 OE zsynchronizowanych do fazy S oraz jego wzrost w komórkach zsynchronizowanych do fazy G1. Na podstawie uzyskanych danych wygenerowała listę genów kodujących histony zależne od replikacji (geny RDH), w obrębie których poziom związanej RNAP2 zmienił się co najmniej dwukrotnie w komórkach PC4 OE w stosunku do linii kontrolnej. Ponieważ eksperyment ChIP-seq został wykonany tylko w jednym powtórzeniu biologicznym, Doktorantka przeprowadziła kolejne eksperymenty immunoprecypitacji chromatyny i wykonała analizę ilości RNAP2 związanej w obrębie badanych genów za pomocą reakcji qPCR. Uzyskane wyniki są spójne i wskazują, że białko PC4 może funkcjonować jako negatywny regulator poziomu polimerazy RNA II związanej w obrębie genów RDH. Aby dalej analizować odmienny wpływ białka PC4 na poziom RNAP2 związanej w obrębie genów RDH w fazie S i G1 cyklu komórkowego Doktorantka wykonała kolejne eksperymenty ChIP-qPCR, tym razem w komórkach z obniżonym poziomem białka PC4 (PC4 KD). Ważnym wynikiem jaki uzyskała była obserwacja, że poziom RNAP2 w obrębie genów RDH w komórkach PC4 KD zsynchronizowanych do fazy S był podwyższony względem linii kontrolnej. W kolejnym etapie badań, Doktorantka postanowiła sprawdzić, czy zaobserwowane zmiany w ilości RNAP2 związanej w obrębie genów RDH przekładają się na wydajność procesu transkrypcji. Wykorzystując technikę qPCR i odpowiednie startery oszacowała poziom transkryptów badanych genów w komórkach PC4 OE oraz PC4 KD. Zaobserwowała wzrost poziomu transkryptów w przypadku komórek PC4 KD

zsynchronizowanych do fazy S, natomiast brak zmiany w przypadku tych samych komórek zsynchronizowanych do fazy G1. W przypadku komórek PC4 OE zsynchronizowanych zarówno do fazy S, jak i fazy G1, różnica w poziomie RNAP2 związanej w obrębie genów RDH nie przekładała się na zmianę wydajności transkrypcji. W następnej kolejności Doktorantka postanowiła sprawdzić czy białko PC4 wpływa na dojrzewanie końca 3' pre-mRNA histonów zależnych od replikacji. Ponownie, za pomocą reakcji qPCR i wykorzystując odpowiednie startery, wykazała, że w komórkach z wyciszonym białkiem PC4 poziom niedojrzałych transkryptów kodujących histony zależne od replikacji jest obniżony względem komórek kontrolnych, natomiast w komórkach wykazujących nadekspresję genu *PC4* poziom ten jest podniesiony. Uzyskany wynik oznacza, że negatywny wpływ białka PC4 na dojrzewanie końca 3' transkryptów kodujących RDH jest niezależny od fazy cyklu komórkowego. W ostatnim etapie badań Doktorantka sprawdziła wpływ białka PC4 na przebieg cyklu komórkowego i wykazała, że wyciszenie ekspresji genu *PC4* zwiększa tempo proliferacji komórek ale nie zmienia profilu rozkładu komórek w cyklu komórkowym. Doktorantka indukowała wyciszenie ekspresji PC4 maksymalnie przez 7 dni, natomiast należałoby sprawdzić, co sama sugeruje, jak komórki PC4 KD funkcjonują po dłuższym czasie. Nie rozumiem dlaczego tak prosty eksperyment, w którym komórki hodowane są kilka-kilkanaście dni dłużej nie został wykonany. Ponadto, uważam że należałoby się również zastanowić jaki wpływ może mieć wyciszenie ekspresji PC4 na inne geny zaangażowane w regulację cyklu komórkowego i tempo proliferacji komórek.

Wyniki przeprowadzonych badań zostały szczegółowo przeanalizowane i klarownie przedstawione z wykorzystaniem ciekawych rycin i wykresów, co znacznie ułatwia ich interpretację oraz podążanie za tokiem myślenia Autorki. Tę część pracy oceniam bardzo wysoko. Niemniej jednak, w moim odczuciu Doktorantka nie wykorzystwała w pełni systemu badawczego, który przygotowała. Na uwagę krytyczną zasługuje również fakt, że eksperyment Chip-Seq został wykonany tylko jeden raz i tylko dla komórek z nadekspresją genu *PC4* oraz odpowiednich komórek kontrolnych. Takiego eksperymentu nie wykonano dla komórek z wyciszeniem genu *PC4*. Co więcej, w toku analizy wyników nasuwają się pytania o odpowiednie kontrole, dlatego proszę o komentarz w tej kwestii. Jaką kontrolę można byłoby wykonać dla eksperymentów ChIP, tak aby wyeliminować potencjalne błędy powstałe na etapie immunoprecypitacji lub późniejszego sekwencjonowania? Co Doktorantka sądzi o wykorzystaniu np. nieswoistych przeciwciał? Czy wykonane reakcje qPCR są wiarygodne a przeprowadzone testy wydajności starterów wystarczające? Ponadto, chciałabym zapytać czy wszystkie analizy qPCR zostały wykonane na tym samym cDNA uzyskanym z tych samych osadów badanych komórek zsynchronizowanych do odpowiedniej fazy cyklu komórkowego, czy materiał był pozyskiwany wielokrotnie.

Rozdział DYSKUSJA jest napisany dojrzałe i rzeczowo. Autorka zastanawia się z jakimi partnerami białkowymi może współdziałać badane przez nią białko PC4, a także w jaki sposób taka potencjalna koregulacja mogłaby aktywować transkrypcję genów kodujących histony zależne od replikacji w fazie G1 a wyciszać ją w fazie S cyklu komórkowego. Swoje wyniki i stawiane hipotezy krytycznie zestawia z danymi literaturowymi i właściwie przedyskutowuje, co świadczy o jej doskonałej orientacji w badanej dziedzinie. Podobnie wysoko oceniam krótkie PODSUMOWANIE, w którym Doktorantka w syntetycznej formie przedstawia najważniejsze wnioski, a także nakreśla perspektywy dalszych badań. W tym miejscu chciałabym jednak poprosić Doktorantkę o rozwinięcie tego wątku i komentarz na temat możliwości wykorzystania linii komórkowych z podwyższoną i obniżoną ekspresją białka PC4 do dalszych badań nad rolą białka PC4 w regulacji genów RDH.

Rozprawa doktorska mgr Aleksandry Brzęk została przygotowana bardzo starannie pod względem edytorskim i graficznym. Jest napisana zrozumiale i poprawnym, naukowym językiem. Autorce zdarzają się tylko nieliczne błędy interpunkcyjne, stylistyczne, czy drobne pomyłki, np. „1000 nukleotydów powyżej i 1000 nukleotydów powyżej TSS”. Moją uwagę zwróciło też późne wprowadzenie skrótów RDH i RIH (dopiero na str. 72), mimo że narracja całej pracy od początku

skupia się na genach kodujących histony zależne i niezależne od replikacji. Te drobne uchybienia nie wpływają w żaden sposób na zrozumienie tekstu i ocenę pracy doktorskiej.

Podsumowanie

Problematyka badawcza podjęta przez mgr Aleksandrę Brzęk jest bardzo aktualna, a otrzymane wyniki mają istotne znaczenie dla poznania funkcji białka PC4. Za pomocą eksperymentów typu immunoprecypitacja chromatyny (ChIP) oraz RT-qPCR Doktorantka wykazała, że białko PC4 jest negatywnym regulatorem transkrypcji genów kodujących histony zależne od replikacji. Co więcej, wpływ ten uzależniony jest od fazy cyklu komórkowego. Ponadto, białko PC4 wpływa na dojrzewanie końca 3' transkryptów badanych genów. Uważam, że na podstawie jednego eksperymentu ChIP-seq nie można wyciągać daleko idących wniosków, jednakże Doktorantka swoje obserwacje potwierdziła w kolejnych, wielokrotnie powtórzonych eksperymentach opartych na technice qPCR. Uzyskane wyniki są spójne i logiczne, zostały również rzetelnie opracowane i wnikliwie przedyskutowane. Mają dużą wartość poznawczą i niewątpliwie stanowią solidną podstawę do dalszych badań nad regulacją ekspresji genów kodujących histony. W związku z powyższym, recenzowaną rozprawę doktorską oceniam bardzo pozytywnie, a przedstawione w recenzji drobne uwagi i komentarze w niczym nie umniejszają tej oceny.

Podsumowując oświadczam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Aleksandry Brzęk w pełni spełnia wymogi stawiane tego typu pracom, określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789) i wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza o przyjęcie tej rozprawy i dopuszczenie pani mgr Aleksandry Brzęk do dalszych etapów postępowania przewidzianego w przewodzie doktorskim.

Edyta Kościańska

Edyta Kościańska



ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań
tel.: centrala 61 852 85 03 sekretariat 61 852 89 19
faks: 61 852 05 32 e-mail: ibch@ibch.poznan.pl
REGON 000849327 NIP 777-00-02-062
<http://www.ibch.poznan.pl>

