



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii
Instytut Genetyki i Biotechnologii
Prof. dr hab. Joanna Kufel



Warszawa, 19-09-2019

Recenzja pracy doktorskiej mgr Mateusza Bajczyka pt. "Rola kompleksu NEXT w biogenezie miRNA"

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Mateusza Bajczyka została wykonana pod kierunkiem Prof. dr hab. Artura Jarmołowskiego w Zakładzie Ekspresji Genów Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Mgr Bajczyk jest pierwszym autorem manuskryptu, który stanowi podstawę rozprawy (obecnie w trakcie recenzji w *Nucleic Acid Res.*), pierwszym autorem pracy przeglądowej w *Plant Physiol.* (2019) oraz współautorem czterech dodatkowych publikacji, w tym jednej przeglądowej. Praca dotyczy syntezy i degradacji cząsteczek mikroRNA u modelowego organizmu roślinnego, *Arabidopsis thaliana*, i wpisuje się w główny nurt badań prowadzonych w grupie Prof. Jarmołowskiego.

Prawidłowe funkcjonowanie wszystkich organizmów wymaga ścisłej koordynacji ekspresji genów, która odbywa się głównie przez regulację transkrypcji, wydajności dojrzewania i stabilności mRNA, przebiegu translacji oraz poziomu, właściwości (modyfikacje) i stabilności białek. Jednym z ważniejszych mechanizmów wyciszania ekspresji głównie na poziomie post-transkrypcyjnym polega na interferencji RNA z udziałem małych cząsteczek mikroRNA (miRNA). Cząsteczki miRNA regulują procesy związane z rozwojem i różnicowaniem komórek, a także odpowiedzią na bodźce, hormony i stres. Proces dojrzewania miRNA jest stosunkowo dobrze poznany, także w komórkach roślinnych, natomiast mechanizmy degradacji tych cząsteczek i czynniki uczestniczące są dużo słabiej opisane.

W swojej pracy doktorskiej mgr Bajczyk podjął się scharakteryzowania interaktomu białka SERRATE (SE), które wchodzi w skład kompleksu Mikroprocesora u roślin i jest zaangażowane w biogenezę miRNA, ale także inne procesy syntezy i dojrzewania RNA. Główne osiągnięcia pracy polegają na zidentyfikowaniu szerokiego zestawu białek oddziałujących z SERRATE, potwierdzeniu i scharakteryzowaniu asocjacji pomiędzy SERRATE i roślinnym kompleksem kontroli jakości RNA NEXT oraz funkcjonalnej analizie roli SERRATE w biogenezie miRNA, a

dokładniej w stymulacji dojrzewania pri-miRNA przez DCL1 oraz degradacji niepotrzebnych cząsteczek przy udziale kompleksu NEXT.

W pracy zastosowano zarówno standardowe metody biologii molekularnej i biochemii dotyczące analizy kwasów nukleinowych i białek, techniki genetyczne (system dwuhybrydowy), jak i zaawansowane analizy proteomiczne (immunoprecypitacja kompleksów białkowych powiązana ze spektrometrią mas), mikroskopowe (FRET-FLIM) czy wysokoprzepustowe sekwencjonowanie RNA. Rozprawa zawiera wszystkie niezbędne części i została przygotowana w sposób umożliwiający zrozumienie omawianych zagadnień i wykonanych badań. Jest napisana po polsku, poprawnie, w sposób jasny i przejrzysty, a błędy czy niezręczności językowe są nieliczne. Dysertacja jest starannie opracowana i ujęta pod względem struktury i zawartości, a także edytorskim.

W usystematyzowanym wstępie autor wyczerpująco przedstawił tematykę związaną z syntezą i degradacją miRNA u roślin oraz opisał czynniki i kompleksy odpowiedzialne za te procesy. Wstęp jest jednak miejscami nieco nazbyt lakoniczny i skupiony wokół zagadnień bezpośrednio związanych z tematyką pracy. Niektóre wątki warto byłoby bardziej rozwinąć, np. koordynację czy współzawodnictwo pomiędzy dojrzewaniem pri-miRNA a splicingiem, jak również porównanie składu i działania kompleksu Mikroprocesora u roślin i zwierząt. O zbyt skrótowym charakterze tej części pracy może świadczyć obecność tylko jednej Ryciny, co nieco dziwi przy omawianiu tak wdzięcznych i jednocześnie kompleksowych obiektów jak egzosom, TRAMP czy NEXT. Brakuje mi też zgrabnego powiązania funkcjonalnego pomiędzy rozdziałami omawiającymi te czynniki i kompleksy. Ponadto, autor nie uniknął pewnych uproszczeń (wymienione w uwagach szczegółowych). Cele pracy są jasno i precyzyjnie sformułowane i dokładnie określają zakres planowanych doświadczeń, a Materiały i Metody są opisane dokładnie i rzeczowo, chociaż procedury eksperymentalne przedstawiono dwoma stylami, w sposób opisowy oraz w punktach na wzór bardzo szczegółowych protokołów laboratoryjnych, co jest dość niezręczne.

Wyniki są przedstawione niezwykle skrupulatnie i czytelnie, ze szczególnym uwzględnieniem kolejnych podejść eksperymentalnych, i tworzą logiczną całość. Każdy z rozdziałów kończy się krótkim podsumowaniem uzyskanych wyników, co ułatwia . Punktem wyjściowym do całej serii badań było określenie sieci interakcji białka SE na podstawie koimmunoprecypitacji powiązanej ze spektroskopią mas. Dane proteomiczne zostały poddane poprawnej analizie statystycznej i starannie przedstawione, a zidentyfikowane białka obecne w kompleksach z SE dokładnie omówione. Kolejne eksperymenty koncentrowały się na oddziaływaniu białka SE z kompleksem NEXT, które zostało potwierdzone i scharakteryzowane kilkoma metodami (dodatkowe doświadczenia immunoprecypitacji, system dwuhybrydowy, FRET-FLIM i pull-down). Ciekawą obserwacją jest słabsza asocjacja helikazy HEN2 z białkiem SE oraz z pozostałymi składnikami kompleksu NEXT, jak również brak bezpośredniego oddziaływania między SE i HEN2, co jest spójne z poprzednimi

doniesieniami (brak współocyszczania SE z HEN2). Wykazano również, że asocjacja SE ze składnikami NEXT oraz innymi interaktorami jest niezależna od obecności RNA. Z kolei zastosowanie systemu dwuhybrydowego oraz metody FRET-FLIM potwierdziło oddziaływania HEN2-ZCCHC8A i HEN2-ZCCHC8B oraz ZCCHC8A-RBM7 i ZCCHC8B-RBM7, a także tworzenie homo- i heterodimerów białek ZCCHC8, co wskazuje na istnienie takich kompleksów w komórkach roślinnych. Istotną kwestią było określenie roli kompleksu NEXT razem z SE w biogenezie miRNA, co zostało przeprowadzone przy użyciu RNA-seq mutantu *hen2-2* oraz przez zbadanie poziomu wybranych pri-miRNA w mutantach pozostałych składników kompleksu NEXT. Podejścia te potwierdziły poprzednie niepełne wyniki akumulacji pri-miRNA w roślinach pozbawionych helikazy HEN2, jak również innych podjednostek kompleksu, wskazując na jego funkcję w degradacji tych cząsteczek. Czym podyktowany był wybór mutantu *hen2-2* do analizy transkryptomicznej, skoro asocjacja HEN2 z białkami RBM7, ZCCHC8 i SE jest stosunkowo słaba? Wybór ten okazał się słuszny, ponieważ akumulacja pri-miRNA w tym mutancie jest najsilniejsza, ale nie jest oczywista. Kolejną ciekawą obserwacją było częściowe przywrócenie poziomu przetestowanych dojrzałych miRNA w podwójnych mutantach z zaburzonymi zarówno dojrzewaniem jak i degradacją pri-miRNA, zapewne na skutek bardzo silnej akumulacji prekursorów. Czy jest możliwe, że dojrzewanie miRNA w tych mutantach przebiega w sposób niezależny od DCL1 i ta ścieżka staje się bardziej aktywna w przypadku silnego nagromadzenia prekursorów miRNA? Wydaje się, że jest to możliwe do sprawdzenia. Nie do końca natomiast zgadzam się z interpretacją ostatniego eksperymentu przedstawionego w rozdziale 5.6, wniosek, że SE rekrutuje kompleks NEXT do degradowanych transkryptów, wyciągnięty na podstawie zbliżonego fenotypu akumulacji substratów NEXT w mutancie *se-2*, jest przedwczesny i nieuprawniony (tym bardziej, że autor używa sformułowania „wynik ten pokazuje” a nie bardziej oględnego „sugeruje” lub „wskazuje”), szczególnie biorąc pod uwagę fakt, że SERRATE bierze udział w innych procesach metabolizmu RNA, niezależnie od kompleksu NEXT, i oddziałuje z wieloma innymi białkami zaangażowanymi w te ścieżki. Dopiero wykonanie dodatkowych eksperymentów, np RIP dla podjednostki kompleksu NEXT w obecności i przy braku SE, pozwoliłoby na taką konkluzję. Niestety, jak zauważa sam autor, oddziaływanie skróconego wariantu SE z NEXT w mutancie *se-2* oraz letalny efekt całkowitego usunięcia tego białka stanowią duże utrudnienie.

Dyskusja uzyskanych wyników jest wnikliwa, rzeczowa i zajmująca. Zawiera przede wszystkim podsumowanie rezultatów stanowiących podstawę pracy, ze szczególnym uwzględnieniem nieoczekiwanych efektów. W niektórych podrozdziałach autor nie uniknął jednak niepotrzebnego ponownego omawiania uzyskanych wyników. Ponadto, nieco szerzej omówione są dodatkowe dane, które nie są wcześniej szczegółowo prezentowane, a które świadczą o zaangażowaniu pomocniczych czynników w różnych etapach biogenezy miRNA lub o dodatkowych funkcjach SERRATE w procesach metabolizmu RNA. Przedstawione tu hipotezy i przypuszczenia stanowią najciekawszą część pracy. Autor przedstawił również przekonujące i częściowo poparte dodatkowymi wynikami wyjaśnienia niektórych rozbieżności w

przeprowadzonych doświadczeniach (nieobecność HYL1 wśród białek współcyszczających się z SE, brak oddziaływania SE-RBM7 w eksperymencie typu pull-down). Interesującym aspektem, podkreślonym przez autora, jest pewna odmienność w oddziaływaniach ludzkiego kompleksu ARS2-NEXT i jego roślinnego odpowiednika SE-NEXT, ponieważ w komórkach roślinnych SE nie oddziałuje bezpośrednio z helikazą HEN2. Ponadto na podstawie opracowanego interaktomu białka SE autor postawił hipotezę, że SERRATE nie tylko jest homologiem ludzkiego białka ARS2, ale także może pełnić rolę analogiczną do ZC3H18, dodatkowego składnika ludzkiego kompleksu NEXT, które prawdopodobnie nie występuje u Arabidopsis. Zastanawiająca jest również możliwość istnienia homo- i heterodimerów białek ZCCHC8 w kompleksie NEXT u Arabidopsis, co byłoby dość nieoczekiwane, ponieważ paralogi przeważnie tworzą alternatywne kompleksy. Jakie mogłoby być funkcjonalne znaczenie takiego rozwiązania? Czy jest to strukturalnie możliwe?

Na podstawie swoich rezultatów, oprócz najistotniejszego dla pracy wniosku, że roślinne białko SERRATE bierze udział zarówno w dojrzewaniu miRNA jak i degradacji nadmiernej ilości prekursorów miRNA, autor proponuje również, że, podobnie jak dla ARS2, funkcje te SERRATE pełni przez oddziaływanie odpowiednio z kompleksem THO/TREX lub NEXT.

Podsumowując, autor wykonał bardzo solidną pracę doświadczalną, eksperymenty zostały przeprowadzone w sposób zaplanowany i skrupulatny. Warto podkreślić, że przedstawione badania wymagają dużej nie tylko systematyczności i sprawności eksperymentalnej, ale przede wszystkim kreatywnego a jednocześnie krytycznego podejścia.

Dysertacja pana mgr Bajczyka, w szczególności jej zawartość merytoryczna, jest na bardzo wysokim poziomie i świadczy o jego samodzielności i dojrzałości naukowej. Praca spełnia ustawowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim, wnioskuję zatem do Rady Wydziału Biologii UAM o dopuszczenie pana mgr Mateusza Bajczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. W związku z wysoką jakością zaprezentowanych pracy doktorskiej wyników oraz ich znaczenia dla rozwoju dziedziny dotyczącej metabolizmu RNA u roślin wnioskuję również o jej wyróżnienie.

Uwagi szczegółowe:

1. Błędy i niezręczności językowe: procesowanie (w sądzie?), mocno zakonserwowany (lepiej silnie zakonserwowany), zerowa mutacja (?), „rdzeń egzosomu nie jest katalitycznie aktywny i do swojej aktywności wymaga białka o aktywności nukleolitycznej” czy „na ten moment”, „kontrola nałożenia”, „analiza z użyciem 53 prekursorów miRNA”, „proces jest generalny (lepiej powszechny)”, „Wykonana w komórkach ludzkich metoda iCLIP na białko RBM7” (metoda nie może być wykonana i na pewno nie NA białko), „ChIPseq na białko SE”, nazbyt częste używanie pewnych słów (m.in. „pokazano”, „zaangażowany”, „również”, „proces”) w sąsiadujących zdaniach, i na koniec- to niefortunne słowo „niniejszy”.

2. str 7. Na liście skrótów są terminy które nie pojawiają się później w tekście: DDL, ta-siRNA, TRBP, HESO1.
3. str 11. MiRNA biorą udział nie tylko w postranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów, ale także transkrypcyjnej. Ponadto znane są nieliczne przykłady aktywacji ekspresji przez miRNA, a nie tylko inhibicji.
4. str 12. MiRNA u roślin są nie tylko kodowane jako niezależne jednostki transkrypcyjne, ale są również obecne w intronach genów kodujących białka lub genów niekodujących RNA. Jest to zresztą wspomniane później w sekcji wyników, ale powinno znajdować się przede wszystkim w tym miejscu wstępu.
5. str 12. Nazwanie kapu dodatkowym zmetylowanym nukleotydem jest uproszczeniem, ponieważ jest to dodatkowa struktura dołączona na drodze enzymatycznej do transkryptu w odwrotnej orientacji poprzez nietypowe wiązanie 5'-5' trójfosforanowe.
6. str. 12. Stwierdzenie, że dojrzewanie miRNA u roślin polega na „dwóch reakcjach cięcia, katalizowanych przez endonukleazy” znowu jest uproszczeniem. Mimo, że mirtronowe miRNA są powszechne w komórkach zwierzęcych a nie roślinnych, jest możliwe że intronowe miRNA powstają również na skutek splicingu i rozcinaniu lariatu (Li et al., PLoS Genetics, 2016, Intron lariat RNA inhibits microRNA biogenesis by sequestering the Dicing complex in *Arabidopsis*).
7. str 21. Egzosom raczej nie bierze udziału w dojrzewaniu tRNA (a to raczej to tak na wszelki wypadek).
8. str 22, ludzki kompleks TRAMP nie jest zaangażowany w obróbkę rRNA, tylko prawdopodobnie w jego degradację (chyba, że autor używa słowa obróbkę w znaczeniu turnover, ale obróbka oznacza raczej processing).
9. str 54. Pod kontrolą jakiego promotora sklonowano gen białka fuzyjnego FLAG-SE?
10. str 58. Niespójność w zdaniu „pokazujące rolę EIF4G w jądrze komórkowym u różnych eukariontów (145, 146)”, podczas gdy obie referencje dotyczą drożdży; owszem pokazano obecność EIF4G w jądrze również w komórkach ssaczych, ale nie w cytowanych pracach. Obecne są również ogólnikowe stwierdzenia, które nie są poparte odpowiednimi referencjami (np. na str 21 „deregulacja egzosomu u ludzi wywołuje wiele chorób neurologicznych”).
11. str 65. Opis techniki FRET-FLIM jest nieco mylący, ponieważ wynika z niego że donorem jest białko GFP a akceptorem RFP, podczas gdy możliwy jest szeroki wybór fluoroforów.
12. str 80. Na Ryc. 20B wykres po prawej stronie powinien być chyba czerwony?
13. Powtórzenia na początku stron 80 i 81.
14. str 87. Analiza northern dla dojrzałych miRNA przedstawiona na Ryc. 25 powinna być nie tylko jakościowa ale też ilościowa (zliczenie sygnału hybrydyzacji).
15. str 90. Autor sam stwierdza, że zastosowanie sieciowania formaldehydem podczas procedury IP mogłoby przyczynić się do uzyskania lepszych wyników. Czy był jakiś powód ominięcia tego

etapu?

16. str 94. Nieścisłość. Drożdżowe białko Ded1 nie może uczestniczyć w separowaniu RNA od EJC, ponieważ u drożdży EJC nie występuje.

17. str 94, błąd logiczny? Ze zdania pod koniec strony wynika, że brak wycięcia dojrzałego miRNA przez DCL1 prowadzi do biogenezy miRNA. Czy autor nie miał raczej na myśli „zahamowania biogenezy miRNA”?

18. str 102. Czy analiza transkryptomu mutantu *se-2* wykonana podczas pracy doktorskiej potwierdziła wcześniejsze wyniki dotyczące obniżenia poziomu bezintronowych transkryptów regulowanych transkrypcyjnie przez SERRATE? Nie zostało to chyba wspomniane w pracy.

19. Kilka błędów w spisie literatury, niepoprawnych lub nie do końca właściwych pozycji literaturowych (np. 131, 146, 169.).

Prof. dr hab. Joanna Kufel

UNIwersytet Warszawski
Instytut Genetyki i Biotechnologii

Prof. Joanna Kufel