



Prof. dr hab. Marta Miączyńska
Pracownia Biologii Komórki
Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej
w Warszawie

Warszawa, 08.05.2016 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej pana mgr. Jakuba Kochana

**p.t.: „Regulacja ekspresji genu wczesnej odpowiedzi komórkowej *IER3*
na poziomie aktywacji promotora i kontroli czasu półtrwania transkryptu.
Zastosowanie metody immunofluorescencji połączonej z smRNA FISH.”**

wykonanej pod kierunkiem pani dr hab. Anety Kaszy
w Zakładzie Biochemii Komórki Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytetu Jagiellońskiego

Rozprawa doktorska pana mgr. Jakuba Kochana dotyczy mechanizmów regulacji ekspresji genu *IER3* (*immediate early response gene 3*). *IER3* jest genem wczesnej odpowiedzi komórkowej, a jego ekspresja jest indukowana w trakcie reakcji zapalnej. Gen *IER3* koduje białko, które nie posiada motywów sekwencyjnych ani strukturalnych analogicznych do znanych w innych białkach. Jego dotychczas poznane funkcje wydają się plejotropowe, związane z regulacją przeżywalności, apoptozy i cyklu komórkowego w różnych typach komórek, a także z fizjologią limfocytów. Głównym celem recenzowanej rozprawy było kompleksowe zbadanie regulacji ekspresji genu *IER3* na dwóch poziomach: aktywacji transkrypcji oraz kontroli czasu półtrwania transkryptu. Ważnym etapem realizacji tego założenia było opracowanie metody do jednoczesnego obrazowania lokalizacji wewnątrzkomórkowej mRNA oraz białka w pojedynczych komórkach. Badania zaprezentowane w rozprawie są aktualne i dotyczą istotnego problemu naukowego, zostały zrealizowane z użyciem nowoczesnych technik doświadczalnych, a ich wyniki poszerzają naszą wiedzę o mechanizmach molekularnych regulujących ekspresję genów wczesnej odpowiedzi komórkowej.

Formalny opis rozprawy

Podstawową część rozprawy stanowi spójny tematycznie zbiór trzech pierwszoautorskich artykułów Doktoranta. Dwa z nich zostały opublikowane, a kolejny przyjęty do druku w zagranicznych recenzowanych periodykach z dziedziny biologii molekularnej, posiadających impact factor. Są to następujące prace:

MIĘDZYNARODOWY INSTYTUT BIOLOGII MOLEKULARNEJ I KOMÓRKOWEJ W WARSZAWIE

ul. Ks. Trojdena 4, 02-109 Warszawa
secretariat@iimcb.gov.pl

tel.: (48 22) 597 07 00, fax: (48 22) 597 07 15
www.iimcb.gov.pl

J. Kochan, M. Wawro, A. Kolka, P. Maczuga, A. Kasza, Transcription factor Elk-1 participates in the interleukin-1 β -dependent regulation of expression of *immediate early response gene 3 (IER3)*. *Cytokine*. 70, 120–125 (2014).

J. Kochan, M. Wawro, A. Kasza, Simultaneous detection of mRNA and protein in single cells using immunofluorescence-combined single-molecule RNA FISH. *BioTechniques*. 59, 209–221 (2015).

J. Kochan, M. Wawro, A. Kasza, IF-combined smRNA FISH reveals interaction of MCP1P1 protein with *IER3* mRNA. *Biology Open*. (2016). Praca przyjęta do druku.

Całość rozprawy liczy 131 stron maszynopisu. Rozprawa rozpoczyna się wykazem stosowanych skrótów oraz streszczeniami w językach polskim i angielskim. Jej kolejnym rozdziałem jest dwudziestostronicowe wprowadzenie teoretyczne do tematyki badań. Następnie przedstawiono cele pracy, podsumowanie wyników, wykaz rycin, wykaz wszystkich publikacji Doktoranta oraz bibliografię liczącą 108 pozycji. W ramach załączników zamieszczono trzy powyższe publikacje będące podstawą rozprawy oraz oświadczenia ich pięciu współautorów (dr hab. Aneta Kasza, mgr Jakub Kochan, mgr Mateusz Wawro, mgr Agnieszka Kolka, dr Piotr Maczuga). Oświadczenia są jasno sformułowane, precyzując dokładnie które z doświadczeń zamieszczonych w publikacjach były wykonane przez którego z autorów. Oświadczenia te nie pozostawiają wątpliwości, iż zdecydowaną większość wszystkich zaprezentowanych eksperymentów wykonał Doktorant. Odegrał także kluczową rolę w ich planowaniu, analizie i interpretacji wyników, a także przygotowaniu manuskryptów. Na podkreślenie zasługuje fakt, że w publikacji w *BioTechniques* mgr Kochan jest jedynym autorem korespondującym, co jest rzadkością na Jego etapie kariery i dowodzi wiodącego wkładu w jej powstanie na każdym etapie pracy.

Ocena merytoryczna

Wprowadzenie jest pierwszą częścią rozprawy i składa się z czterech rozdziałów opisujących kolejno: gen *IER3* i jego produkt białkowy, czynnik transkrypcyjny ELK1, regulację czasu półtrwania transkryptów oraz obrazowanie RNA w pojedynczych komórkach. Generalnie, ta część rozprawy jest bardzo dobrze napisana, a dobór treści prawidłowy. Doktorant w sposób jasny, uporządkowany i zwięzły przedstawia wszystkie najważniejsze zagadnienia leżące u podstaw Jego badań. Na podkreślenie zasługuje szeroki wachlarz piśmiennictwa, na którym oparte jest Wprowadzenie. Doktorant cytuje w nim zarówno najstarsze oryginalne prace, jak również najnowszą literaturę. W sposób rzetelny przedstawia także istniejące w piśmiennictwie kontrowersje. Wprowadzenie, napisane w sposób sprawny i ciekawy, przekonuje o dużej wiedzy Doktoranta w przedmiocie swych badań.

Moim jedynym zastrzeżeniem, poza nielicznymi uwagami o charakterze edytorskim, jest zbyt mała liczba rycin, które mogłyby ułatwić lekturę Wprowadzenia (jest ich zaledwie dwie, choć na str. 28 podany jest odnośnik do nieistniejącej Ryciny 3). Przykładowo, opisy struktury domeny ETS (str. 19) czy domen w strukturze ELK1 (str. 20) powinny zostać zilustrowane schematami.

Z obowiązku recenzenta, wymieniam poniżej drobne uchybienia formalne i dotyczące terminologii, które zauważyłam podczas lektury Wprowadzenia:

- Niespójności we wprowadzaniu i wyjaśnianiu skrótów, np. dotyczące kinaz MAP i ERK. W wykazie skrótów rozpisano jedynie skrót MAPK, w tekście najpierw kilkakrotnie pojawiają się skróty ERK i MAPK (bez rozpisania), wyjaśnione dopiero na stronie 20. Generalnie uważam, że w wykazie skrótów nie było potrzeby zamieszczania skrótów DNA czy RNA, ale można było wymienić mikroRNA (miRNA), które w tekście pojawiają się w różnych wersjach pisowni.

- W zakresie polskiej terminologii, uważam, że bardziej poprawną formą jest regulacja „potranskrypcyjna” niż „posttranskrypcyjna”, będąca kalką z języka angielskiego. Podobne zastrzeżenia mam do określenia „sekwestracja”, choć rzeczywiście nie ma ono dobrego odpowiednika w języku polskim.

- Nazewnictwo i pisownia ludzkich genów „*S1/Rpn2* i *S5a/Rpn10*” (str. 17) wydają się niepoprawne.

- Przy omawianiu białka MCPIP1 (str. 24) należało podać także jego inną nazwę (regnase-1), która choć nie jest oficjalna, jest stosowana w publikacjach (np. w cytowanej w tym rozdziale publikacji w *Cell* z roku 2015).

Po Wprowadzeniu, Doktorant zamieścił dwa krótkie punkty prezentujące szczegółowe cele pracy, które zostały poprawnie sformułowane i zrealizowane w toku badań. Następnie, także w punktach, Doktorant przedstawił **podsumowanie wyników** opisanych w trzech załączonych publikacjach. Jest to zwięzłe i poprawne zestawienie najważniejszych osiągnięć poznawczych, dokonanych podczas wykonywania badań do rozprawy.

PUBLIKACJA 1:

J. Kochan, M. Wawro, A. Kolka, P. Maczuga, A. Kasza, Transcription factor Elk-1 participates in the interleukin-1 β -dependent regulation of expression of *immediate early response gene 3 (IER3)*. *Cytokine*. 70, 120–125 (2014).

W publikacji tej zidentyfikowano gen *IER3* jako gen docelowy czynnika transkrypcyjnego ELK1, co jest nowym i istotnym odkryciem. Wykazano, iż w komórkach stymulowanych interleukiną IL-1 β , po aktywacji kaskady MEK/ERK następuje wiązanie czynnika transkrypcyjnego ELK1 do promotora *IER3* i określono miejsce tego wiązania. Ponadto stwierdzono, że regulacja ekspresji *IER3* przez ELK1 zachodzi w sposób niezależny od czynnika SRF, z którym ELK1 zwykle współdziała. W pracy tej zastosowano szereg metod biologii molekularnej, w tym m.in. lucyferazowe testy reporterowe, ilościowy PCR w czasie rzeczywistym, Western blotting, immunoprecypitację chromatyny czy analizy sekwencji promotorowych *in silico*. Publikacja jest napisana w sposób bardzo jasny, a przedstawione wyniki są przekonujące i nie budzą żadnych zastrzeżeń.

PUBLIKACJA 2:

J. Kochan, M. Wawro, A. Kasza, Simultaneous detection of mRNA and protein in single cells using immunofluorescence-combined single-molecule RNA FISH. *BioTechniques*. 59, 209–221 (2015).

W publikacji tej opisano w sposób szczegółowy opracowanie i weryfikację metody do jednoczesnego wykrywania RNA i białek w sposób ilościowy poprzez obrazowanie pojedynczych komórek, tzw. IF/smRNA FISH (immunofluorescence with single-molecule RNA fluorescence in situ hybridization). Jest to świetny przykład systematycznej i skrupulatnej pracy metodycznej, zakończonej sukcesem. W części głównej publikacji, w ramach czterech rycin, opisano zasadnicze etapy opracowania i weryfikacji metody. Publikacji towarzyszy suplement z siedmioma dalszymi rycinami oraz bardzo szczegółowy protokół eksperymentalny, umożliwiający zastosowanie nowo opracowanej metody. Jestem przekonana, że jest to cenny przyczynek do nauki światowej i że metoda ta będzie szeroko używana.

Mimo iż bardzo wysoko oceniam wartość powyższej publikacji, jej lektura nasunęła mi kilka dalszych pytań lub wątpliwości:

- Schematy doświadczalne zamieszczone na Ryc. 3A oraz S5A nie były dla mnie jasno opisane. Mogę się domyślać, że próbki oznaczone EtOH były utrwalane etanolem, ale nie rozumiem jak traktowane były próbki oznaczone PBS? Czy niewyjaśniony skrót PF w panelach B tych samych rycin oznacza paraformaldehyd? Generalnie, legendy do powyższych rycin uważam za zbyt skrótowe i niewystarczające.

- W tekście zabrakło mi wytłumaczenia dlaczego do blokowania używano acetylowanej albuminy. Czy acetylacja służy jedynie usunięciu RNaz (czego mogę się domyślać po przeczytaniu szczegółowego protokołu doświadczalnego) czy także innym celem?

- W doświadczeniach z Ryc. 4C nie było dla mnie jasne dlaczego zastosowano kulturę komórek HeLa z ekspresją zmutowanego inhibitora I κ B α (I κ B α -DN) i w jaki sposób zidentyfikowano takie modyfikowane komórki? Czy identyfikacja ta była oparta tylko na braku translokacji czynnika transkrypcyjnego RelA/p65 do jądra w komórkach z ekspresją I κ B α -DN (co nie jest jednoznaczne, gdyż translokacja ta nie musi zajść we wszystkich normalnych komórkach i w tym samym czasie po stymulacji). Dlaczego nie zastosowano dodatkowego barwienia wykrywającego I κ B α -DN?

- W nawiązaniu do poprzedniego pytania, czy podczas testowania metody IF/smRNA FISH sprawdzano jednoczesne wykrywanie więcej niż jednego białka? Podobnie, czy można wykryć dwa rodzaje mRNA i jedno białko? Czy takie rozszerzenie metody jest możliwe? Zastanawiam się również czy próbowano wykrywać jednocześnie mRNA i kodowane przez nie białko, dla jakiegokolwiek przykładu mRNA/białko?

PUBLIKACJA 3:

J. Kochan, M. Wawro, A. Kasza, IF-combined smRNA FISH reveals interaction of MCPIP1 protein with *IER3* mRNA. *Biology Open*. (2016). Praca przyjęta do druku.

W tym manuskrypcie opisano nieznanie wcześniej oddziaływanie mRNA *IER3* z białkiem MCPIP1 o aktywności RNazy, wykazując tym samym nową rolę MCPIP1 w regulacji poziomu transkryptu genu *IER3*. W pracy tej zidentyfikowano elementy w sekwencji niekodującej 3'UTR genu *IER3*, które są niezbędne do wiązania przez MCPIP1, co potwierdzono poprzez ich usunięcie. Stosując opracowaną w publikacji nr 2 metodę IF/smRNA FISH i obrazowanie mikroskopowe, wykazano następnie współwystępowanie

w komórce białka MCPIP1 i mRNA *IER3*. Oddziaływanie pomiędzy nimi potwierdzono dodatkowo techniką immunoprecypitacji RNA. Zastosowanie nieaktywnie katalitycznie zmutowanej wersji białka MCPIP1 pozwoliło udowodnić, że aktywność RNazowa białka MCPIP1 pośredniczy w regulacji poziomu transkryptu *IER3*. Generalnie, manuskrypt prezentuje logiczny ciąg doświadczeń i ich solidne wyniki, opisane i przedyskutowane w sposób poprawny.

Zauważyłam jedynie kilka drobnych niedociągnięć głównie o charakterze edytorskim, które być może uda się poprawić w trakcie korekty manuskryptu przed ostateczną publikacją:

- Ryc. 1. W panelu E nazwy konstruktów stosowanych dalej w panelu F i opisanych w tekście nie zostały jasno zaznaczone. Legenda panelu E jest również myląca, gdyż nie przedstawia wyników testu reporterowego (zamieszczonego dopiero w panelu F), czego czytelnik spodziewa się po pierwszym zdaniu legendy. Ponadto, kolejność opisywania paneli Ryc. 1 w tekście nie zgadza się z kolejnością ich przedstawienia na rycinie, co utrudnia czytanie i śledzenie wyników.

- Na str. 7 manuskryptu błędnie podano odnośnik do Ryc. 1A, zamiast 2A.

- Ryc. 4B. Aby przekonująco udokumentować specyficzność przeciwciała rozpoznającego tylko jeden prążek na immunoblocie, należało pokazać cały żel, a nie tylko jego wycinek.

- Dla ułatwienia czytania, przy pierwszym użyciu nieaktywnego katalitycznie mutanta MCPIP1 (D141A) można było wspomnieć, że mutacja ta dotyczy domeny podobnej do NYN/PIN. Obecnie informacja o tej domenie pojawia się w streszczeniu, wstępie i dyskusji, ale nie w tekście wyników, gdzie opisano mutanta D141A.

Ocena edytorskiej strony rozprawy

Pod względem edytorskim, praca jest napisana niezwykle starannie, poprawnym językiem polskim w częściach polskojęzycznych. Również trzy anglojęzyczne publikacje zostały przygotowane w sposób bardzo rzetelny i profesjonalny. Oprócz niezwykle drobnych usterek wymienionych powyżej nie mam żadnych zastrzeżeń do strony edytorskiej rozprawy.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska pana mgr. Jakuba Kochana podejmuje istotny problem naukowy z dziedziny molekularnej biologii komórki. Wyniki uzyskane przez Doktoranta stanowią ważny przyczynek do literatury przedmiotu i odsłaniają nowe mechanizmy regulacji ekspresji genu *IER3*. Przedstawione w rozprawie doświadczenia zostały poprawnie zaplanowane, wykonane i zinterpretowane, co jest potwierdzone faktem ich publikacji w recenzowanych czasopismach międzynarodowych. Należy podkreślić, że oprócz trzech pierwszoautorskich prac stanowiących podstawę niniejszej rozprawy, Doktorant jest współautorem trzech kolejnych publikacji, co świadczy o Jego dużej aktywności naukowej. Dorobek publikacyjny i obecna rozprawa potwierdzają wiedzę teoretyczną i sprawność eksperymentalną mgr. Kochana.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr. Jakuba Kochana do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na wysoką wartość rozprawy wnoszę o jej wyróżnienie stosowną nagrodą.

Marta Mięczyńska