



POLSKA AKADEMIA NAUK

**Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego**

Zakład Biochemii

Pracownia Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych

ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

instytut biologii doświadczalnej  
im. M. Nenckiego PAN

Tel. (22)5892456; Fax: (22) 8225342, e-mail: j.redowicz@nencki.gov.pl

Prof. dr hab. Maria Jolanta Rędownicz  
Kierownik Pracowni Molekularnych Podstaw  
Ruchów Komórkowych

Warszawa, 9 maja 2016 r.

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr. Jakuba Kochana pt.:  
„Regulacja ekspresji genu wczesnej odpowiedzi komórkowej *IER3* na poziomie aktywacji  
promotora i kontroli czasu półtrwania transkryptu.  
Zastosowanie metody immunofluorescencji połączonej z smRNA FISH”  
wykonanej w Zakładzie Biochemii Komórki Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii  
Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem dr hab. Anety Kaszy

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr. Jakuba Kochana dotyczy ważkiego zagadnienia regulacji transkrypcji genów, które mimo iż po raz pierwszy opisane w latach 50. ubiegłego wieku z racji swej złożoności i specyficzności komórkowej wciąż stanowi zagadkę, zwłaszcza na poziomie molekularnym. Dotychczas ukazało się ponad pół miliona publikacji adresujących mechanizmy procesu transkrypcji, przy czym ich liczba stale rośnie. A więc są to zagadnienia będące w centrum zainteresowania świata nauki, niezwykle istotne dla funkcjonowania komórek. Rozprawa doktorska wpisuje się zatem w główny nurt tych badań. Autor w swojej rozprawie skupił się na regulacji ekspresji genu wczesnej odpowiedzi komórkowej, badając nie tylko czynniki regulujące transkrypcję, ale zajął się także analizą losu powstałego transkryptu i regulacji jego trwałości.

### Formalny opis rozprawy

Doktorant skorzystał z możliwości, jaką daje Art. 13 pkt. 2 ustawy o stopniach i tytułach naukowych, i przygotował rozprawę doktorską w formie „(...) *spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych lub przyjętych do druku w czasopismach naukowych (...)*”. Na rozprawę składają się trzy artykuły doświadczalne (dwa z nich już opublikowane, a trzeci przyjęty do druku), które ukazały się (lub wkrótce ukażą) w czasopismach z listy filadelfijskiej w latach 2014-2016. Należy podkreślić, że wszystkie publikacje zawarte w rozprawie spełniają ustawowy wymóg spójności tematycznej.

Rozprawa zawiera także liczące 18 stron Wprowadzenie (zawierające dwie ryciny), streszczenie w języku polskim i angielskim, listę stosowanych skrótów, jasno wyrażony cel rozprawy, wykaz rycin zamieszczonych we Wprowadzeniu, wykaz wszystkich publikacji Doktoranta oraz bibliografię odnoszącą się do wprowadzenia (108 pozycji).

Przyznam się, że po raz pierwszy przyszło mi oceniać taką formę rozprawy, stosowana jest ona bowiem rzadko, z wielu zapewne przyczyn, ale za podstawową uważam wieloautorskość publikacji i zatem trudność wykazania, jaki jest faktycznie udział doktoranta w ich powstaniu. Idealnie było by, gdyby autorami publikacji był jedynie doktorant i jego promotor, ale to praktycznie niemożliwe, m.in. z powodu konieczności potwierdzenia swoich obserwacji możliwie jak najszerszym spektrum metod i technik badawczych. Niniejsza rozprawa bliska jest temu ideałowi, albowiem współautorami publikacji są poza doktorantem i promotorem jedna (w dwóch publikacjach) lub trzy osoby (w jednej publikacji). Z

oświadczeń współautorów wynika, że mgr Kochan miał wiodący udział w powstanie publikacji składających się na rozprawę doktorską.

W sytuacji, gdy na rozprawę składają się publikacje recenzent ma moim zdaniem ułatwione zadanie, gdyż zawarte w nich wyniki zostały już poddane wnikliwej ocenie recenzentów wyznaczonych przez redakcję czasopism, którzy z reguły nie mają żadnych obiekcji do ostrej krytyki i wskazywania konieczności wykonania dodatkowych doświadczeń.

### Ocena merytoryczna

Rozpocznę ocenę od obszernego **Wprowadzenia**, które *de facto* nie jest wymagane w świetle obowiązujących przepisów, tym bardziej doceniam jego zamieszczenie. W tej części rozprawy Doktorant opisuje mechanizmy prowadzące do stanu zapalnego, skupiając się na mediatorach reakcji zapalnej, a w szczególności na produkcji genu wczesnej odpowiedzi komórkowej, *IER3*. Synteza tego białka, zaangażowanego w regulację apoptozy, jest indukowana przez szereg czynników, m.in. przez cytokiny IL-6 czy TNF. Doktorant opisuje budowę genu *IER3* i regulację jego transkrypcji, funkcje białka IER3 w szeregu procesów komórkowych, jego budowę i występowanie w komórce. Przedstawia również najnowsze informacje na temat czynnika transkrypcyjnego ELK1, który bierze udział w regulacji transkrypcji *IER3*. Tę część wprowadzenia Doktorant wzbogaca w rycinę ilustrującą ścieżki sygnałowe prowadzące do aktywacji czynnika *ELK1*. Kolejnym zagadnieniem poruszonym we Wprowadzeniu jest regulacja czasu półtrwania transkryptów, która zależy od bezpośredniego ich oddziaływania z szeregiem białek (m.in. MCP1) i miRNA. Autor opisuje również metody obrazowania RNA w komórkach (również przyżyciowo), zamieszczając przykładową ilustrację detekcji mRNA dla *IL-6* w komórkach HeLa. W tekście znajdują się odniesienia do własnych badań, króciutko podsumowujące najważniejsze obserwacje zawarte w publikacjach stanowiących rozprawę doktorską. Wprowadzenie jest napisane w sposób klarowny, bardzo dobrą polszczyzną, czyta się je więc z łatwością, nie znalazłam tu nawet literówek. Oczywiście każda publikacja jest również opatrzona wstępem, wprowadzającym do tematyki badań w oparciu o najnowsze doniesienia literaturowe. Bardzo podobała mi się również forma przedstawienia **wykazu skrótów**, a mianowicie powołanie się na oryginalne nazwy związków/białek w języku angielskim. Ponieważ jako recenzent powinien szukać przysłowiowej dziury w całym, to muszę napisać, że zabrakło mi informacji dotyczącej w jaki sposób białka uczestniczące w procesie transkrypcji i sam transkrypt są dostarczane do miejsc ich przeznaczenia. Mam tu na myśli doniesienia o udziale białek motorycznych w procesach zachodzących w jądrze komórkowym, który mimo iż znany od ponad dekady wciąż nie jest w głównym nurcie zainteresowania badaczy zajmujących się transkrypcją i replikacją DNA.

Doktorant postawił sobie ambitne **cele**, a mianowicie analizę regulacji ekspresji genu wczesnej odpowiedzi komórkowej *IER3* na poziomie aktywacji transkrypcji oraz poznanie regulacji potranskrypcyjnej mRNA dla *IER3*. Analiza wyników przedstawionych w publikacjach wykazuje, że Doktorant zrealizował je w całości.

Dla realizacji zamierzeń Doktorant zastosował wiele nowoczesnych technik biologii molekularnej i komórkowej, opisanych w podrozdziałach „**Materials and methods**” publikacji. Liczba wykorzystanych metod i przeprowadzonych analiz jest imponująca. Poza rutynowymi technikami jak hodowla komórek eukariotycznych, immunodetekcja białek, przygotowanie konstruktów ekspresyjnych czy techniki PCR, na uwagę zwracają analiza ekspresji transkryptów testem aktywności lucyferazy, immunoprecypitacja chromatyny (w publikacji w *Cytokine*), hybrydyzacja *in situ* umożliwiająca analizę oddziaływania mRNA z białkiem (smRNA FISH) w publikacji w *BioTechniques* czy RNA immunoprecipitation (w *Biology Open*).

Należy podkreślić, że wszystkie wyniki zostały przejrzysto zilustrowane, wykonano niezbędne kontrole pozytywne i negatywne, a uzyskane dane poddano wnikliwej analizie statystycznej. W pierwszej z publikacji (*Cytokine* z 2014 r., IF 2,664) uzyskane **wyniki** przedstawiono w pięciu złożonych rycinach. Doktorant zbadał udział szlaku przekazywania sygnału MEK/ERK w indukowanej przez IL-1 $\beta$  aktywacji transkrypcji *IER3* oraz przeprowadził analizę *in silico* sekwencji promotora *IER3* w celu znalezienia potencjalnych miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych. W toku dobrze zaplanowanych i wykonanych doświadczeń Doktorant zbadał udział szlaku przekazywania sygnału MEK/ERK w indukowanej przez IL-1 $\beta$  aktywacji transkrypcji *IER3* i przeprowadził analizę *in silico* promotora genu *IER3* w celu zidentyfikowania potencjalnych miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych. Wykazał, że czynnik ELK1 bierze udział w indukowanej przez IL-1 $\beta$  aktywacji promotora *IER3*. Ponadto, udało mu się zidentyfikować miejsce wiązania czynnika ELK1 w promotorze *IER3* (pozycja -115 do -95) oraz zweryfikować to wiązanie *in vivo*. Uzyskał również dane wskazujące, że ELK1 bierze udział w regulacji *IER3* w sposób niezależny od białka SRF (*serum response factor*), regulującego transkrypcję wielu genów i często występującego w kompleksie właśnie z ELK1. Uzyskane w tej części rozprawy wyniki wskazały na potrzebę przeprowadzenia dodatkowych badań, które poszerzyłyby wiedzę o naturze i roli oddziaływania *IER3* i ELK1 oraz o losie transkryptu *IER3*. Tym zagadnieniom poświęcone są dwie kolejne publikacje.

W dalszych badaniach Doktorant wdrożył i zoptymalizował metodę smRNA FISH (*fluorescence in situ hybridization*) w celu określenia ilości i lokalizacji wewnątrzkomórkowej badanych przez siebie transkryptów oraz opracował metodę umożliwiającą jednoczesne obrazowanie *in cellulo* białek i pojedynczych cząsteczek RNA (IF/smRNA FISH). Autor wykazał, że opracowana przez niego metoda może być porównywalna z ilościowym PCR (qPCR) natomiast nie jest tożsama ze standardową immunofluorescencją. Wyniki tych analiz zawarł w artykule opublikowanym w 2015 r. w *BioTechniques* (IF 2,948), w której poza pięcioma złożonymi rycinami znajduje się olbrzymi materiał przedstawiony jako *Supplementary material* składający się z siedmiu złożonych rycin, pięciu tabeli oraz szczegółowych opisów/protokołów metod wraz z informacjami nt. składu odczynników oraz użytej aparatury. Dzięki tej metodzie Doktorantowi udało się wykazać m.in. bezpośrednie oddziaływanie RNazy MCPIP1 z mRNA dla IL-6, które to oddziaływanie było postulowane w oparciu o uzyskane wcześniej przez prof. Jolantę Jurę wyniki wskazujące, że ludzkie białko MCPIP1 uczestniczy w degradacji mRNA IL-1 $\beta$ . Również i doniesienia z własnej grupy wskazywały na zależność pomiędzy ekspresją tej RNazy a aktywnością interleukiny IL-1 $\beta$ .

Mając zatem informację o potencjalnym oddziaływaniu RNazy i transkryptu oraz opracowane przez siebie narzędzia do weryfikacji tych oddziaływań w komórce, Doktorant postanowił sprawdzić, czy faktycznie MCPIP1 i transkrypt *IER3* oddziałują ze sobą i jakie skutki niesie to oddziaływanie. Wyniki tych analiz znalazły się w artykule przyjętym do druku w *Biology Open* (IF 2,416). Publikacja ta zawiera cztery złożone ryciny oraz tzw. *supplementary information*, zawierające m.in. sekwencje stosowanych starterów i konstruktów lucyferazy. Doktorant wykazał, że MCPIP1 wpływa na stabilność mRNA dla *IER3* oraz potwierdził oddziaływanie *in situ* i *in vivo* MCPIP1 z mRNA *IER3*. Przeprowadził także analizę *in silico* 3'UTR *IER3* w celu sprawdzenia, czy znajdują się tam ewolucyjnie zachowane sekwencje i struktury oraz zidentyfikował fragment 3'UTR *IER3*, znajdujący się w tzw. rejonie non-ARE (czyli nie wzbogaconym w reszty adeniny i uracylu), potencjalnie biorący udział w wiązaniu MCPIP1. W toku następnych badań potwierdził, że rejon ten jest niezbędny do przyłączania białka MCPIP1.

Konsekwencją przedstawienia rozprawy w postaci publikacji jest brak tradycyjnych części, w tym dyskusji. Osobiście najbardziej lubię ten fragment rozpraw doktorskich, bo tu widać dojrzałość (lub jej brak) doktorantów. W tym przypadku zamiast jednej dyskusji są ich aż trzy, w tym jedna (w *BioTechniques*) w połączeniu z wynikami, co jak miemam wynika z

wymagań redakcji czasopisma. Teksty poszczególnych dyskusji są napisane żywym językiem, kończą się wskazaniem planów przyszłych badań, które w przypadku dwóch pierwszych publikacji zostały zrealizowane w kolejnych artykułach. Dyskusja pierwszego artykułu (w *Cytokine*) skupia się na analizie uzyskanych wyników w oparciu o informacje literaturowe dotyczące mechanizmów oddziaływania (i ich regulacji) czynnika ELK1 z *IER3*, a więc wiodącego tematu tej publikacji. W kolejnym artykule (w *Biotechniques*) Doktorant konfrontuje opracowaną przez siebie modyfikację metody FISH z innymi technikami obrazowania transkryptów, podkreślając jej zalety i wskazując na możliwe zastosowania badawcze. Natomiast w ostatnim artykule zaprezentowanym jako część rozprawy Doktorant omawia biologiczne znaczenie interakcji RNazy MCPIP1 z transkrypcją *IER3* oraz dyskutuje strukturalne aspekty tego oddziaływania. Wskazuje również na możliwość wykorzystania oddziaływań MCPIP1 z innymi transkryptami genów wczesnej odpowiedzi na czynniki prozapalne w celu stworzenia leków przeciwzapalnych.

Mimo iż dyskusja została "roztrójona", to wynika z niej, że Doktorant jest w pełni świadom znaczenia swoich wyników, potrafi je umiejętnie skonfrontować z danymi literaturowymi, i tam gdzie trzeba krytycznie je ocenić.

### **Podsumowanie**

Rozprawa doktorska Pana mgr. Jakuba Kochana ma bardzo dużą wartość poznawczą i niewątpliwie znacznie wzbogaca naszą wiedzę o mechanizmach regulacji oddziaływań białko/DNA i białko/RNA, kluczowych w procesach transkrypcji i translacji. Wyjątkowo obszerny materiał doświadczalny, niezwykle bogaty warsztat metodyczny, w dużej mierze oparty o przygotowane przez siebie narzędzie badawcze oraz bardzo dobrze udokumentowane i opublikowane oryginalne wyniki badań świadczą o doskonałym przygotowaniu Autora do samodzielnej pracy naukowej. Doktorant wykazał się umiejętnością zdefiniowania ważkiego problemu badawczego, który następnie z powodzeniem rozwiązał, wskazując również kierunek przyszłych badań, w tym aplikacyjnych. Wykazał się także znajomością rozległego piśmiennictwa w dziedzinie swoich zainteresowań oraz zdolnością do krytycznej analizy własnych wyników badań w oparciu o dane literaturowe. W mojej ocenie uzyskane wyniki są nowatorskie i stanowią zaczyn do dalszych badań, zaś wyciągnięte przez niego wnioski oraz wysnute hipotezy są w pełni uzasadnione. Na uwagę zasługuje fakt, że Doktorant jest również współautorem trzech innych artykułów opublikowanych (lub przyjętych do druku) w czasopiśmie z listy filadelfijskiej, w tym tak prestiżowym jak BBA *Gene Regulatory Mechanisms* (z IF ok. 6,332). Wszystkie one dotyczą obszaru zainteresowań Doktoranta, wskazując, że jego wiedza i umiejętności praktyczne są przydatne również innym badaczom.

W mojej ocenie rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Biorąc pod uwagę powyższe, przedkładam Radzie Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego wniosek o dopuszczenie mgr. Jakuba Kochana do dalszych etapów przewodu doktorskiego w celu uzyskania przez niego stopnia doktora nauk biologicznych w zakresie biochemii.

Ponadto, zważywszy na wysoką wartość naukową i metodyczną recenzowanej rozprawy doktorskiej z całym przekonaniem wnioskuję o jej wyróżnienie stosowną dla szacownej Rady nagrodą.

Maria Jolanta Rędownicz