



Gliwice, 25 kwietnia 2016

Recenzja rozprawy doktorskiej pana Mateusza Wawro pt. „Rola biologiczna białek z rodziny MCPIP”.

Praca dotyczy bardzo interesującego zagadnienia o znaczeniu fundamentalnym jakim jest regulacja ekspresji genów poprzez kontrolę stabilności mRNA. Autor rozprawy podjął się charakterystyki białek z rodziny MCPIP, której najlepiej poznany element, białko MCPIP1 (ZC3H12A), ma zaledwie 10-cioletnią historię, a pozostałe białka z rodziny są bardzo słabo scharakteryzowane, tak więc podjęty temat jest w pełni uzasadniony. Biologiczna funkcja białek MCPIP wiązana jest głównie z wygaszaniem odpowiedzi prozapalnej, co w przypadku MCPIP1 odbywa się poprzez degradację transkryptów cytokin. Dlatego też we wstępie teoretycznym Autor skupił się na przedstawieniu metabolizmu mRNA. Omówione zostały pokrótce, lecz w przystępny sposób, ścieżki degradacji oraz kontroli jakości mRNA. Szerzej omówiono kontrolę stabilności mRNA, a w szczególności aktualny stan wiedzy na temat białek z rodziny MCPIP. Autor podszedł do tematu w sposób klasyczny opisując przede wszystkim wybrane (z uwagi na obszerność tematu) białka wiążące się z RNA, jak również działanie miRNA. Interesujące byłoby również inne spojrzenie, np. włączenie do wstępu krótkiego rozdziału o kontroli stabilności poprzez metylację RNA, czy też wpływu optymalizacji kodonów na stabilność mRNA. Moje zastrzeżenia budzi wykorzystanie akronimów nazw angielskich jako tytułów rozdziałów, np. NSD (uważam, że w tytule powinna znaleźć się pełna nazwa po polsku, w tym wypadku: Degradacja transkryptów pozbawionych kodonu STOP).

Cele pracy zostały podane w punktach. Sformułowano dwa główne cele oraz szereg celów szczegółowych. Zabrakło jedynie informacji, że praca dotyczy białek ludzkich.

Opis materiałów i metod stanowi najobszerniejszą część rozprawy. Zawarto w niej wszystkie niezbędne informacje oraz opisano strategie klonowania wektorów wykorzystanych w pracy. Dla przejrzystości opisu procedur składy buforów umieszczono pod tekstem, a także zebrano wiele informacji w tabelach (np. o stosowanych w PCR starterach oraz składy mieszanin reakcyjnych).

CENTRUM ONKOLOGII – INSTYTUT IM. MARII SKŁODOWSKIEJ-CURIE. ODDZIAŁ W GLIWICACH

44-101 GLIWICE, UL. WYBRZEŻE ARMII KRAJOWEJ 15

Centrala Tel.: +48 32 278 86 66

Dyrekcja Tel.: +48 32 278 96 18

E-mail: onkologia@io.gliwice.pl

NIP: 5250008057

Centrala Fax: +48 32 231 35 12

Dyrekcja Fax: +48 32 230 78 07

Url: www.io.gliwice.pl

REGON: 000288366

Doktorant wykazał się znajomością szerokiego panelu metod stosowanych w biologii molekularnej, zarówno podstawowych jak i bardziej wyrafinowanych (m.in. hodowle komórek eukariotycznych, transfekcje, testy funkcjonalne, klonowanie DNA, mutageneza ukierunkowana, izolacja RNA i QRT-PCR, testy lucyferazowe, immunoprecypitacja, Western blotting, oczyszczanie białek z komórek eukariotycznych i bakteryjnych, immunofluorescencja połączona z smRNA-FISH, analizy mikroskopowe i statystyczne).

Opisy metod są na tyle precyzyjne i kompletne, że mogłyby służyć jako manual dla kolejnego pokolenia studentów. Jedynym niedociągnięciem wydaje się być brak informacji jak sprzęgano barwnik Quasar 570 z sondami do detekcji mRNA. Natomiast jedyną nieścisłością – rozbieżność pomiędzy informacją podaną w metodyce badań oddziaływań białka MCPIP4 z transkryptami *MCPIP1* (na stronie 57), a tą podaną w wynikach (np. na Ryc. 12). W opisie metod podano błędną informację dotyczącą wprowadzanego konstruktów genowego. Na tym etapie przydatna byłaby również informacja w jaki sposób zaprojektowano sondy (czy pokrywają równomiernie cały transkrypt?) oraz po co stosowane jest drugie utrwalanie komórek. Moje zastrzeżenia budzi wybór starterów do detekcji mRNA *MCPIP2* w RT-PCR – uważam, że ten zestaw na matrycy DNA i cDNA może amplifikować produkt identycznej długości i należałoby to sprawdzić.

Zgodnie z wytyczonymi celami pracy wyniki zawarto w dwóch częściach. W pierwszej Autor skupił się na określeniu właściwości ludzkich białek MCPIP2-4 w odniesieniu do lepiej poznanego białka MCPIP1, które jest uznaną rybonukleazą (preferowana nazwa wg bazy NCBI: ribonuclease ZC3H12A). Analizy rozpoczął od porównania sekwencji aminokwasowej wszystkich białek z rodziny, która wykazała, że w białkach MCPIP2-4 zachowane są wszystkie reszty aminokwasowe kluczowe dla aktywności nukleazowej. Ponieważ jednym z głównych substratów dla białka MCPIP1 jest transkrypt kodujący *IL6*, aktywność nukleazową pozostałych białek z rodziny oceniano również na podstawie ich zdolności do degradacji tego transkryptu. Udowodniono, że wszystkie białka MCPIP mają zdolność do degradacji transkryptu *IL6*, a w serii ciekawie zaplanowanych eksperymentów z wykorzystaniem lucyferazy jako genu reporterowego pokazano, że odbywa się to za pośrednictwem 3'UTR transkryptu i zachodzi z udziałem struktury typu „spinka do włosów”. Autor rozprawy udowodnił również, że mutacja w domenie nukleazowej każdego z badanych białek MCPIP (zamiana kluczowej dla wiązania jonów magnezu reszty kwasu asparaginowego na alaninę) całkowicie znosi zdolność do destabilizacji transkryptu *IL6*. Następnie wykazał, że białka z rodziny MCPIP, ale nie ich mutanty, hamują również aktywność genu reporterowego zawierającego rejon 3'UTR *MCPIP1* i pokazał kolokalizację białka MCPIP4 z transkryptem *MCPIP1* w komórkach HeLa. Sugeruje to, że destabilizacja mRNA *MCPIP1* może zachodzić dzięki bezpośrednim oddziaływaniom pomiędzy badanym białkiem i mRNA. Nasuwa się pytanie, czy w badanym fragmencie 3'UTR *MCPIP1* również obecna jest struktura typu „spinka do włosów”.

Zwieńczeniem eksperymentów w układzie komórkowym wskazujących, że białka MCPIP działają destabilizująco na wybrane transkrypty miało być potwierdzenie aktywności RNazowej białka MCPIP4 w testach *in vitro*. Eksperyment ten nie przyniósł zadowalających rezultatów, głównie

z powodu trudności z uzyskaniem odpowiedniej ilości rekombinowanego białka i będzie kontynuowany.

Przedstawione w części pierwszej badania wymagały od Autora rozprawy olbrzymiego nakładu pracy zakończonej większym, bądź mniejszym sukcesem: uzyskania licznych konstruktów genetycznych, wykonania w odpowiedniej liczbie powtórzeń precyzyjnych pomiarów w testach z lucyferazą, określenia stabilności endogennego mRNA, czy też oczyszczenia białka rekombinowanego.

W części drugiej wyników Autor skupił się na określeniu roli biologicznej białka MCPIP2, które jak dotąd jest najstąbiej zbadanym białkiem rodziny. W celu scharakteryzowania profilu ekspresji na poziomie RNA wykorzystał komercyjnie dostępne panele cDNA z prawidłowych ludzkich tkanek, a także przebadał wybrane linie komórkowe. Ponieważ najwyższą ekspresję MCPIP2 wykryto w mózgu, skupił się głównie na linach pochodzenia nerwowego. Wśród nich najwyższą ekspresję *MCPIP2* zaobserwował w komórkach linii SH-SY5Y. Komórki te pod wpływem kwasu retinowego różnicują do komórek neuropodobnych, co wiąże się z kilkukrotnym wzrostem ekspresji *MCPIP2*. Autor rozprawy zbadał również wpływ estrów forboleu oraz czynników prozapalnych na poziom mRNA *MCPIP2* w tych komórkach. Poczynił ciekawe obserwacje, które rodzą kolejne pytania szerzej rozwinięte w Dyskusji.

W dalszej części pracy przedstawiono informację istotną również dla wyników prezentowanych w części pierwszej: białko MCPIP2 z dołączoną metką (tutaj V5) od strony N- bądź C-końca działa jednakowo hamująco na aktywność lucyferazy z 3'UTR IL6. Położenie metki ma jednak znaczenie przy detekcji białka w warunkach natywnych – metka od N-końca jest dostępna dla przeciwciała, w przeciwieństwie do metki umieszczonej od strony C-końca. Dlatego do badania wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka MCPIP2 wykorzystano wektor kodujący białko z metką od N-końca. Co ciekawe, pokazana lokalizacja w postaci granul na terenie cytoplazmy jest bardzo podobna do punktowego barwienia białka MCPIP4 z metką Myc na C-końcu białka (Ryc. 12). Elementem badania roli biologicznej białka MCPIP2 jest również wpływ jego nadekspresji (oraz mutantu w domenie nukleazowej) na proliferację i żywotność komórek. Na uwagę zasługuje fakt, że w pracy stosowane są komplementarne metody w celu potwierdzenia poczynionych obserwacji.

W Dyskusji Autor rozprawy w bardzo dojrzały sposób odniósł się do uzyskanych wyników wyjaśniając różne aspekty metodyczne, odnosząc się do dostępnej literatury oraz snując plany na przyszłość. Autor nie ukrywa, że część z pokazanych w rozprawie badań ma charakter badań wstępnych i konieczne są dalsze eksperymenty. Planuje m.in. wyłączenie ekspresji MCPIP2 w technologii CRISPR, czy też dalsze badania funkcji białka w komórkach różnicujących. Rozprawę zamyka podsumowanie najistotniejszych wyników i wnioski oraz streszczenie, które w pełni oddaje treść pracy.

Rozprawa doktorska jest napisana bardzo starannie i w przystępny sposób. Również Ryciny są wysokiej jakości i czytelne bez konieczności szukania informacji w tekście. Autor na ogół opisuje

precyzyjnie to co przedstawiono na rycinach (za wyjątkiem testów z wykorzystaniem lucyferazy jako genu reporterowego, gdzie na podstawie aktywności lucyferazy wnioskowano pośrednio o stabilności transkryptów, co zostało jednak dokładnie omówione w Dyskusji).

Autor nie uniknął drobnych błędów – w części wyników pisze o kwasie glutaminowym zamiast o asparaginowym (D). Pomijając nieliczne błędy literowe czy stylistyczne, pojawiają się błędnie cytowane ryciny:

1. str. 76 – ryc. 7 – w legendzie jest D zamiast B;
2. str. 77 – ryc. 8 – cytowanie w tekście i logika sugerują odwrotną kolejność i zamianę A z B miejscami;
3. str. 78 – ryc. 9B i 9C – cytowania w tekście na odwrot;
4. str. 81 – w tekście błędnie powołano się na rycinę 10, a cytowana jest już właściwa 12;
5. ryc. 13 – brakuje oznaczeń A i B.

Z punktu widzenia organizacji rozprawy zadziwiający jest niemal całkowity brak numeracji rozdziałów i podrozdziałów, co ogranicza możliwości prostego odniesienia się do konkretnego rozdziału (choćby na etapie recenzji).

Podsumowanie.

Rozprawa doktorska Pana Mateusza Wawro dotyczy interesującego zagadnienia o znaczeniu fundamentalnym. Autor zrealizował cele pracy i wyciągnął właściwe wnioski. Wykazał się przy tym znajomością bogatego warsztatu metodycznego. W mojej opinii praca stanowi znaczące osiągnięcie naukowe i spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w artykule 13, ust. 1 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.), wnoszę więc o dopuszczenie Pana Mateusza Wawro do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na rzetelność pracy, dojrzały sposób prezentacji i wysoki poziom merytoryczny proponuję rozważenie przez Radę Naukową możliwości wyróżnienia pracy.

dr hab. Wiesława Widlak,
profesor nadzwyczajny Centrum Onkologii - Instytutu,
Oddział w Gliwicach