

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr Mateusza Wilamowskiego pt. „Charakterystyka specyfiki degradacji transkryptów przez MCPIP1”

Celem przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej była biochemiczna oraz strukturalna analiza specyfiki degradacji transkryptów przez rekombinowane białko MCPIP1. Temat ten jest naturalną konsekwencją zainteresowań zespołu, w którym badania nad funkcją i mechanizmem działania białka MCPIP1 prowadzone są od kilku lat. Dysponując wiedzą, że białko MCPIP1 degraduje transkrypty rozpoznając w ich końcach 3'UTR struktury spinek RNA o zróżnicowanej sekwencji nukleotydowej, zaplanowano szereg badań mających na celu określenie specyfiki substratowej, kinetyki degradacji oraz powinowactwa białka względem oligonukleotydów RNA i dłuższych transkryptów. Badania te uzupełniono analizą stanu oligomeryzacji białka MCPIP1 oraz podjęto próby określenia jego struktury poprzez badania krystalograficzne. W badaniach wykorzystano rekombinowane białko typu dzikiego lub jego fragmenty oraz wersję z mutacją w domenie RNazowej w miejscu katalitycznym. Wartością dodaną jest opracowanie testu analizy powinowactwa MCPIP1_{D141N} do substratów, który może zostać wykorzystany w przesiewowej analizie inhibitorów białka MCPIP1.

Zadaniem recenzenta jest przedstawienie szczegółowo uzasadnionej oceny, czy rozprawa doktorska, przygotowywana w tym przypadku pod opieką promotora i promotora pomocniczego, stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w danej dyscyplinie naukowej oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. O oryginalności uzyskanych wyników najlepiej świadczy fakt, że większość z nich została już opublikowana w *Scientific Reports*, a Pan Mateusz Wilamowski jest pierwszym autorem tej pracy i uczestniczył we wszystkich etapach przygotowania manuskryptu.

Wstęp do rozprawy doktorskiej ma za zadanie wprowadzenie czytelnika w tematykę rozprawy, ale również powinien wykazać ogólną wiedzę teoretyczną kandydata. Doktorant

opisuje przede wszystkim białka z rodziny MCPIP, ale również wybrane przykłady mechanizmów degradacji RNA. Wstęp, mimo, że relatywnie krótki (15 stron) zawiera wiele szczegółowych informacji. Koncentruje się raczej na działaniu konkretnych białek w opisywanych procesach degradacji RNA, a nie na samym procesie, myślę, że ze szkodą dla przedstawienia ogólnej idei mechanizmu. Na podstawie lektury Wstępu, wiedzę teoretyczną kandydata określiłabym więc jako szczegółową.

W części Materiały i Metody przedstawiono w przystępny sposób niemal wszystkie metody wykorzystane w pracy, podając najbardziej istotne informacje konieczne do lektury i interpretacji Wyników. Przedstawiono jakie kontrole pozytywne, czy negatywne stosowano, jak również testowane modele alternatywne w niektórych analizach (których finalnie nie wykorzystano w Wynikach), co świadczy o prawidłowym podejściu do badań naukowych i kreatywności. Materiały i Metody nie są w pełni komplementarne z Wynikami: zabrakło np. opisu SDS-PAGE (opisano jedynie elektroforezę natywną, nie podając jednak drobiazgów w postaci ilości nanoszonego białka), czy też opisu jak zmierzono widma emisji fluorescencji przedstawione na Ryc. 10 oraz testu opóźnionej migracji w żelu (EMSA) przedstawionego na Ryc. 11 (wg opisu pod ryciną, wykonanego w innych warunkach niż podano w metodach na str. 41-42). Oczekiwałam nieco więcej szczegółów dotyczących klonowania opisanego na stronie 37 (pozostaje w domyśle, że sprawdzono orientację wstawki przy klonowaniu na tępe końce). Dziwny jest również sposób wprowadzania wstawki dsDNA do wektora pcDNA3.0 w miejsce DraI (trzy miejsca w wektorze, zakładam więc, że błędnie podano miejsce restrykcyjne). Nie jest jasne dlaczego skład buforu do kolumny chromatograficznej (analityczne sączenie molekularne – str. 41) podano w opisie do Ryc. 15, a nie w metodach. Tu także nie podano ilości białka nanoszonego na kolumnę.

Jak wspomniałam, część wyników przedstawionych w rozprawie (dotyczących specyfiki substratowej MCPIP1 wobec krótkich substratów oraz tworzenia oligomerów) przeszła już weryfikację i została oceniona przez recenzentów publikacji. Wyniki opublikowane uzupełniono w rozprawie prezentacją danych z procedury oczyszczania rekombinowanego białka, czy też kontrolnych eksperymentów (np. wykluczających możliwość, że obserwowana aktywność nukleazowa białka MCPIP1 wynika z niedoskonałości metody oczyszczania białek z lizatu *E. coli*). Przedstawione wyniki to zarówno ogrom pracy laboratoryjnej, jak i analiz wykorzystujących szereg programów (typu WebLogo, DynaFit4,

czy też szczególnie przydatne w tej pracy Vienna RNA web server oraz mFOLD do modelowania struktur RNA, itd.), dzięki którym prezentowane wyniki są nie tylko bardziej wartościowe, ale i atrakcyjne wizualnie. Wyniki przedstawione są w sposób logiczny i zrozumiały. Nie mam większych zastrzeżeń co do sposobu interpretacji przedstawionych danych oraz wyciąganych wniosków. Przedstawiono dowody na to, że MCPIP1 jest endonukleazą i przecina preferencyjnie jednoniciowe fragmenty pętli w strukturze RNA typu spinki do włosów. Na podstawie testów kinetycznych postawiono tezę, że indukowana aktywnością MCPIP1 degradacja oligonukleotydów tworzących struktury spinki RNA o krótkich trzonach jest szybsza niż w przypadku oligonukleotydów tworzących spinki RNA o dłuższych trzonach (choć na stronie 98 w rozdziale Dyskusja mowa o spinkach RNA, które charakteryzują się krótkimi regionami tworzącymi jednoniciową pętlę, na co, wg mnie, przedstawione eksperymenty nie wskazują). Zaobserwowano również aktywność egzonukleazy, która jest widoczna niemal zawsze (oprócz Ryc. 2B) również w reakcjach z zastosowaniem katalitycznego mutantu MCPIP1_{D141N}, co mogłoby sugerować, że reszta aminokwasowa kwasu asparaginowego będąca elementem kieszeni katalitycznej domeny nukleazowej PIN jest istotna jedynie dla aktywności endonukleazowej białka MCPIP1. Rozdzielenie aktywności endonukleazy od egzonukleazy miałyby konsekwencje w interpretacji wyników prezentowanych np. na Ryc. 3D, gdzie porównano densytometrycznie ilości nietrawionych oligonukleotydów RNA w różnych punktach czasowych testu degradacji spinek o różnej długości (mIL-6₈₂₋₁₀₆ oraz mIL-6₈₅₋₁₀₁). Patrząc na rozdział produktów degradacji w żelu nie mam wątpliwości, że degradacja oligonukleotydu krótszego jest znacznie wydajniejsza niż dłuższego, czego wykres tak wyraźnie nie odzwierciedla. Trudno jest mi się zgodzić z opinią przedstawioną na stronie 54, że aktywność RNazowa MCPIP1_{D141N} względem ssRNA jest marginalna. Na podstawie wyniku z Ryc. 7 trudno również obronić tezę, że MCPIP1 katalizuje hydrolizę wiązań fosfodiesterowych pomiędzy nukleotydami C2 oraz A3 w sekwencji mIL-6₈₅₋₉₃ ter. ACA. W mojej opinii, dodanie sekwencji terminalnej 5'-ACA-3' do oligonukleotydu mIL-6₈₅₋₉₃ nie wpływa znacząco na wzorec degradacji.

W warunkach *in vitro* wydajne trawienie RNA przez MCPIP1 obserwowane jest z reguły po kilku godzinach, choć aktywność egzonukleazy widoczna jest już w pierwszym punkcie pomiarowym, czyli po 30 minutach. Ponieważ w rozprawie nie ma odniesienia do innych RNaz, pojawia się pytanie jak inne RNazy pracowałyby w tych warunkach. Innymi

słowami, jak można określić poziom aktywności katalitycznej białka MCPIP1 wobec RNA? Większość analiz prowadzono *in vitro* w czasie do 4 godzin, choć degradację dłuższych transkryptów prowadzono do 8 lub nawet 20 godzin. Zakładając, że standardy pracy były porównywalne we wszystkich eksperymentach, eksperyment kontrolny przedstawiony na Ryc. 5 gwarantuje, że przynajmniej do 4 godzin inkubacji nie ma degradacji RNA niezależnej od MCPIP1, co zachodzi prawdopodobnie po 20 godzinach inkubacji (Ryc. 14).

Najstabszą stroną rozprawy są braki w opisach rycin. Rycina 16 jest z powodu tych braków zupełnie niezrozumiała. Pozostałe ryciny są czytelne, mimo to uważam, że na każdej rycinie pokazującej wyniki elektroforezy powinny być podane wielkości zarówno markera jak i obserwowanych produktów (tam gdzie jest to możliwe). Szkoda, że na niektórych rycinach markera wielkości w ogóle zabrakło, szczególnie brakuje mi go na Ryc. 11 – uzyskany rozdział byłby łatwiejszy do interpretacji (szczególnie obraz 25-nukleotydowego oligo w 1% żelu agarozowym jest trudny do zaakceptowania). Na Ryc. 1A powinien się znaleźć również fragment białka MCPIP1₄₃₈₋₅₉₉, zastosowany w pracy jako kontrola negatywna (Ryc. 5). W opisie do rycin przedstawiających wyniki degradacji oligonukleotydów nie wyjaśniono skrótu OH-, na Ryc. 9 brak wyjaśnienia co oznaczają residua i jak interpretować wykres (*nota bene*, warto było podać informację, że ciąg dalszy ryciny jest na następnych stronach). Z Ryc. 14A wynika, że część reakcji była prowadzona bez obecności białka, natomiast w tekście podano informację, że jako eksperymenty kontrolne przeprowadzono analizę degradacji fragmentu transkryptu IL-8 przez MCPIP1_{D141N}. Czy jest to eksperyment pokazany na Ryc. 14A? Część rycin zawartych w rozprawie została opracowana na bazie rycin z publikacji – na Ryc. 15 zostały opisy po angielsku (w legendzie: choć wiadomo o co chodzi można dyskutować, czy zawartości różnych frakcji zostały wyliczone na podstawie powierzchni profili elucji uzyskanych w eksperymencie filtracji żelowej, czy na podstawie pola powierzchni pod krzywymi po dopasowaniu rozkładów Gaussa); na Ryc. 19 – drobna pomyłka w numeracji alfabetycznej zdjęć (przydatna byłaby też skala wielkości). W opisie do Ryc. 21 powinna znaleźć się informacja, że strukturę uzyskano w obecności oligonukleotydu DNA (o sekwencji hIL-6₈₂₋₉₈ 17D-1, choć w Dyskusji na stronie 97 mowa o RNA).

W Dyskusji Autor rozprawy omówił uzyskane wyniki rozważając różne aspekty metodyczne i odnosząc się do dostępnej literatury. Na podstawie wykonanych analiz biochemicznych oraz strukturalnych zaproponował model działania białka MCPIP1, w którym

RNA jest wiązane do formy dimerycznej białka, co wymusza utworzenie tetrameru i degradację RNA. Sporo miejsca autor poświęca rozważaniom na temat struktury przestrzennej białka MCPIP1 ponieważ analizy krystalograficzne mają być kontynuowane. Sposób prowadzenia Dyskusji potwierdza, że kandydat posiada wiedzę teoretyczną oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej (na zaangażowanie w pracę naukową wskazują również Podziękowania umieszczone na str. 1 rozprawy).

Rozprawę zamyka podsumowanie najistotniejszych wyników. Przedstawiono je w dziewięciu punktach, które dobrze odzwierciedlają zaprezentowane w rozprawie dane, a wnioski uważam za dosyć wyważone. Jedynie w dwóch punktach mam pewne wątpliwości, czy nie doszło do drobnej nadinterpretacji uzyskanych wyników: wzrost powinowactwa domeny PIN względem substratów po dołączeniu domeny palca cynkowego typu CCCH uznaję za prawdziwy tylko w przypadku niektórych substratów, a wniosek o bezpośredniej degradacji mRNA IL-6, IL-8 oraz C/EBP β przez MCPIP1 uważam za nieuprawniony w świetle pokazanych w pracy wyników (pokazano jedynie degradację krótkich fragmentów RNA pochodzących z 3'UTR IL-6, a nie degradację mRNA).

Streszczenie rozprawy (umieszczone na początku) w pełni oddaje treść pracy. Autor akcentuje fakt, że białko MCPIP1 w pierwszej kolejności prowadzi hydrolizę w obrębie jednoniciowego fragmentu pętli w strukturze RNA typu spinki do włosów RNA. Nie rozumiem jedynie dlaczego pojawiło się tutaj stwierdzenie, że MCPIP1 wykazuje obniżoną aktywność katalityczną względem jednoniciowych fragmentów RNA.

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). Tym niemniej, pod względem edytorskim rozprawa jest niemal bezbłędna (błędy literowe, czy stylistyczne pojawiają się sporadycznie). Autor rozprawy używa formy bezosobowej lub liczby mnogiej (dlatego też, w niniejszej recenzji celowo używam formy bezosobowej). Nie mam również zastrzeżeń co do precyzji w formułowaniu zdań (błędy są incydentalne, np. w streszczeniu napisano o oligonukleotydzie DNA tworzącym 25 nt pętlę zamiast o 25 nt oligonukleotydzie DNA tworzącym pętlę). Kwestią dyskusyjną jest czy białko jest ekspresjonowane, czy ulega ekspresji. Rozprawa zawiera obszerny wykaz skrótów (również objaśnień), w którym

umieściłabym również molowy współczynnik absorpcji ϵ , TMAE, RCF, a skoro jest tutaj eIF4AIII, to również Barentsz mógłby być. Skrót NDM dotyczy zapewne mechanizmu degradacji transkryptów zawierających przedwczesny kodon terminacji translacji w mRNA (a nie obecności STOP w ogóle).

Podsumowanie.

W swojej rozprawie doktorskiej Pan Mateusz Wilamowski podjął się wyjaśnienia w jaki sposób białko MCP1P1 rozpoznaje unikalne matryce molekularne. Autor zrealizował cele pracy i wyciągnął właściwe wnioski. Wykazał się przy tym znajomością unikalnego warsztatu metodycznego. W mojej opinii rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, dokumentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Rozprawa doktorska spełnia więc warunki określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. z późniejszymi zmianami o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, wnoszę więc o dopuszczenie Pana Mateusza Wilamowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wiesława Widłak

prof. dr hab. Wiesława Widłak

Centrum Onkologii – Instytut

im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr Mateusza Wilamowskiego pt. „Charakterystyka specyfiki degradacji transkryptów przez MCPIP1”

Celem przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej była biochemiczna oraz strukturalna analiza specyfiki degradacji transkryptów przez rekombinowane białko MCPIP1. Temat ten jest naturalną konsekwencją zainteresowań zespołu, w którym badania nad funkcją i mechanizmem działania białka MCPIP1 prowadzone są od kilku lat. Dysponując wiedzą, że białko MCPIP1 degraduje transkrypty rozpoznając w ich końcach 3'UTR struktury spinek RNA o zróżnicowanej sekwencji nukleotydowej, zaplanowano szereg badań mających na celu określenie specyfiki substratowej, kinetyki degradacji oraz powinowactwa białka względem oligonukleotydów RNA i dłuższych transkryptów. Badania te uzupełniono analizą stanu oligomeryzacji białka MCPIP1 oraz podjęto próby określenia jego struktury poprzez badania krystalograficzne. W badaniach wykorzystano rekombinowane białko typu dzikiego lub jego fragmenty oraz wersję z mutacją w domenie RNazowej w miejscu katalitycznym. Wartością dodaną jest opracowanie testu analizy powinowactwa MCPIP1_{D141N} do substratów, który może zostać wykorzystany w przesiewowej analizie inhibitorów białka MCPIP1.

Zadaniem recenzenta jest przedstawienie szczegółowo uzasadnionej oceny, czy rozprawa doktorska, przygotowywana w tym przypadku pod opieką promotora i promotora pomocniczego, stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w danej dyscyplinie naukowej oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. O oryginalności uzyskanych wyników najlepiej świadczy fakt, że większość z nich została już opublikowana w *Scientific Reports*, a Pan Mateusz Wilamowski jest pierwszym autorem tej pracy i uczestniczył we wszystkich etapach przygotowania manuskryptu.

Wstęp do rozprawy doktorskiej ma za zadanie wprowadzenie czytelnika w tematykę rozprawy, ale również powinien wykazać ogólną wiedzę teoretyczną kandydata. Doktorant

opisuje przede wszystkim białka z rodziny MCP1P, ale również wybrane przykłady mechanizmów degradacji RNA. Wstęp, mimo, że relatywnie krótki (15 stron) zawiera wiele szczegółowych informacji. Koncentruje się raczej na działaniu konkretnych białek w opisywanych procesach degradacji RNA, a nie na samym procesie, myślę, że ze szkodą dla przedstawienia ogólnej idei mechanizmu. Na podstawie lektury Wstępu, wiedzę teoretyczną kandydata określiłabym więc jako szczegółową.

W części Materiały i Metody przedstawiono w przystępny sposób niemal wszystkie metody wykorzystane w pracy, podając najbardziej istotne informacje konieczne do lektury i interpretacji Wyników. Przedstawiono jakie kontrole pozytywne, czy negatywne stosowano, jak również testowane modele alternatywne w niektórych analizach (których finalnie nie wykorzystano w Wynikach), co świadczy o prawidłowym podejściu do badań naukowych i kreatywności. Materiały i Metody nie są w pełni komplementarne z Wynikami: zabrakło np. opisu SDS-PAGE (opisano jedynie elektroforezę natywną, nie podając jednak drobiazgowo w postaci ilości nanoszonego białka), czy też opisu jak zmierzono widma emisji fluorescencji przedstawione na Ryc. 10 oraz testu opóźnionej migracji w żelu (EMSA) przedstawionego na Ryc. 11 (wg opisu pod ryciną, wykonanego w innych warunkach niż podano w metodach na str. 41-42). Oczekiwałam nieco więcej szczegółów dotyczących klonowania opisanego na stronie 37 (pozostaje w domyśle, że sprawdzono orientację wstawki przy klonowaniu na tępe końce). Dziwny jest również sposób wprowadzania wstawki dsDNA do wektora pcDNA3.0 w miejsce DraI (trzy miejsca w wektorze, zakładam więc, że błędnie podano miejsce restrykcyjne). Nie jest jasne dlaczego skład buforu do kolumny chromatograficznej (analityczne sączenie molekularne – str. 41) podano w opisie do Ryc. 15, a nie w metodach. Tu także nie podano ilości białka nanoszonego na kolumnę.

Jak wspomniałam, część wyników przedstawionych w rozprawie (dotyczących specyfiki substratowej MCP1P1 wobec krótkich substratów oraz tworzenia oligomerów) przeszła już weryfikację i została oceniona przez recenzentów publikacji. Wyniki opublikowane uzupełniono w rozprawie prezentacją danych z procedury oczyszczania rekombinowanego białka, czy też kontrolnych eksperymentów (np. wykluczających możliwość, że obserwowana aktywność nukleazowa białka MCP1P1 wynika z niedoskonałości metody oczyszczania białek z lizatu *E. coli*). Przedstawione wyniki to zarówno ogrom pracy laboratoryjnej, jak i analiz wykorzystujących szereg programów (typu WebLogo, DynaFit4,

czy też szczególnie przydatne w tej pracy Vienna RNA web server oraz mFOLD do modelowania struktur RNA, itd.), dzięki którym prezentowane wyniki są nie tylko bardziej wartościowe, ale i atrakcyjne wizualnie. Wyniki przedstawione są w sposób logiczny i zrozumiały. Nie mam większych zastrzeżeń co do sposobu interpretacji przedstawionych danych oraz wyciąganych wniosków. Przedstawiono dowody na to, że MCPIP1 jest endonukleazą i przecina preferencyjnie jednoniciowe fragmenty pętli w strukturze RNA typu spinki do włosów. Na podstawie testów kinetycznych postawiono tezę, że indukowana aktywnością MCPIP1 degradacja oligonukleotydów tworzących struktury spinki RNA o krótkich trzonach jest szybsza niż w przypadku oligonukleotydów tworzących spinki RNA o dłuższych trzonach (choć na stronie 98 w rozdziale Dyskusja mowa o spinkach RNA, które charakteryzują się krótkimi regionami tworzącymi jednoniciową pętlę, na co, wg mnie, przedstawione eksperymenty nie wskazują). Zaobserwowano również aktywność egzonukleazy, która jest widoczna niemal zawsze (oprócz Ryc. 2B) również w reakcjach z zastosowaniem katalitycznego mutantu MCPIP1_{D141N}, co mogłoby sugerować, że reszta aminokwasowa kwasu asparaginowego będąca elementem kieszeni katalitycznej domeny nukleazowej PIN jest istotna jedynie dla aktywności endonukleazowej białka MCPIP1. Rozdzielenie aktywności endonukleazy od egzonukleazy miałyby konsekwencje w interpretacji wyników prezentowanych np. na Ryc. 3D, gdzie porównano densytometrycznie ilości nietrawionych oligonukleotydów RNA w różnych punktach czasowych testu degradacji spinek o różnej długości (mIL-6₈₂₋₁₀₆ oraz mIL-6₈₅₋₁₀₁). Patrząc na rozdział produktów degradacji w żelu nie mam wątpliwości, że degradacja oligonukleotydu krótszego jest znacznie wydajniejsza niż dłuższego, czego wykres tak wyraźnie nie odzwierciedla. Trudno jest mi się zgodzić z opinią przedstawioną na stronie 54, że aktywność RNazowa MCPIP1_{D141N} względem ssRNA jest marginalna. Na podstawie wyniku z Ryc. 7 trudno również obronić tezę, że MCPIP1 katalizuje hydrolizę wiązań fosfodiesterowych pomiędzy nukleotydami C2 oraz A3 w sekwencji mIL-6₈₅₋₉₃ ter. ACA. W mojej opinii, dodanie sekwencji terminalnej 5'-ACA-3' do oligonukleotydu mIL-6₈₅₋₉₃ nie wpływa znacząco na wzorec degradacji.

W warunkach *in vitro* wydajne trawienie RNA przez MCPIP1 obserwowane jest z reguły po kilku godzinach, choć aktywność egzonukleazy widoczna jest już w pierwszym punkcie pomiarowym, czyli po 30 minutach. Ponieważ w rozprawie nie ma odniesienia do innych RNaz, pojawia się pytanie jak inne RNazy pracowałyby w tych warunkach. Innymi

słowami, jak można określić poziom aktywności katalitycznej białka MCPIP1 wobec RNA? Większość analiz prowadzono *in vitro* w czasie do 4 godzin, choć degradację dłuższych transkryptów prowadzono do 8 lub nawet 20 godzin. Zakładając, że standardy pracy były porównywalne we wszystkich eksperymentach, eksperyment kontrolny przedstawiony na Ryc. 5 gwarantuje, że przynajmniej do 4 godzin inkubacji nie ma degradacji RNA niezależnej od MCPIP1, co zachodzi prawdopodobnie po 20 godzinach inkubacji (Ryc. 14).

Najślabszą stroną rozprawy są braki w opisach rycin. Rycina 16 jest z powodu tych braków zupełnie niezrozumiała. Pozostałe ryciny są czytelne, mimo to uważam, że na każdej rycinie pokazującej wyniki elektroforezy powinny być podane wielkości zarówno markera jak i obserwowanych produktów (tam gdzie jest to możliwe). Szkoda, że na niektórych rycinach markera wielkości w ogóle zabrakło, szczególnie brakuje mi go na Ryc. 11 – uzyskany rozdział byłby łatwiejszy do interpretacji (szczególnie obraz 25-nukleotydowego oligo w 1% żelu agarozowym jest trudny do zaakceptowania). Na Ryc. 1A powinien się znaleźć również fragment białka MCPIP1₄₃₈₋₅₉₉, zastosowany w pracy jako kontrola negatywna (Ryc. 5). W opisie do rycin przedstawiających wyniki degradacji oligonukleotydów nie wyjaśniono skrótu OH-, na Ryc. 9 brak wyjaśnienia co oznaczają residua i jak interpretować wykres (*nota bene*, warto było podać informację, że ciąg dalszy ryciny jest na następnych stronach). Z Ryc. 14A wynika, że część reakcji była prowadzona bez obecności białka, natomiast w tekście podano informację, że jako eksperymenty kontrolne przeprowadzono analizę degradacji fragmentu transkryptu IL-8 przez MCPIP1_{D141N}. Czy jest to eksperyment pokazany na Ryc. 14A? Część rycin zawartych w rozprawie została opracowana na bazie rycin z publikacji – na Ryc. 15 zostały opisy po angielsku (w legendzie: choć wiadomo o co chodzi można dyskutować, czy zawartości różnych frakcji zostały wyliczone na podstawie powierzchni profili elucji uzyskanych w eksperymencie filtracji żelowej, czy na podstawie pola powierzchni pod krzywymi po dopasowaniu rozkładów Gaussa); na Ryc. 19 – drobna pomyłka w numeracji alfabetycznej zdjęć (przydatna byłaby też skala wielkości). W opisie do Ryc. 21 powinna znaleźć się informacja, że strukturę uzyskano w obecności oligonukleotydu DNA (o sekwencji hIL-6₈₂₋₉₈ 17D-1, choć w Dyskusji na stronie 97 mowa o RNA).

W Dyskusji Autor rozprawy omówił uzyskane wyniki rozważając różne aspekty metodyczne i odnosząc się do dostępnej literatury. Na podstawie wykonanych analiz biochemicznych oraz strukturalnych zaproponował model działania białka MCPIP1, w którym

RNA jest wiązane do formy dimerycznej białka, co wymusza utworzenie tetrameru i degradację RNA. Sporo miejsca autor poświęca rozważaniom na temat struktury przestrzennej białka MCPIP1 ponieważ analizy krystalograficzne mają być kontynuowane. Sposób prowadzenia Dyskusji potwierdza, że kandydat posiada wiedzę teoretyczną oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej (na zaangażowanie w pracę naukową wskazują również Podziękowania umieszczone na str. 1 rozprawy).

Rozprawę zamyka podsumowanie najistotniejszych wyników. Przedstawiono je w dziewięciu punktach, które dobrze odzwierciedlają zaprezentowane w rozprawie dane, a wnioski uważam za dosyć wyważone. Jedynie w dwóch punktach mam pewne wątpliwości, czy nie doszło do drobnej nadinterpretacji uzyskanych wyników: wzrost powinowactwa domeny PIN względem substratów po dołączeniu domeny palca cynkowego typu CCCH uznaję za prawdziwy tylko w przypadku niektórych substratów, a wniosek o bezpośredniej degradacji mRNA IL-6, IL-8 oraz C/EBP β przez MCPIP1 uważam za nieuprawniony w świetle pokazanych w pracy wyników (pokazano jedynie degradację krótkich fragmentów RNA pochodzących z 3'UTR IL-6, a nie degradację mRNA).

Streszczenie rozprawy (umieszczone na początku) w pełni oddaje treść pracy. Autor akcentuje fakt, że białko MCPIP1 w pierwszej kolejności prowadzi hydrolizę w obrębie jednoniciowego fragmentu pętli w strukturze RNA typu spinki do włosów RNA. Nie rozumiem jedynie dlaczego pojawiło się tutaj stwierdzenie, że MCPIP1 wykazuje obniżoną aktywność katalityczną względem jednoniciowych fragmentów RNA.

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). Tym niemniej, pod względem edytorskim rozprawa jest niemal bezbłędna (błędy literowe, czy stylistyczne pojawiają się sporadycznie). Autor rozprawy używa formy bezosobowej lub liczby mnogiej (dlatego też, w niniejszej recenzji celowo używam formy bezosobowej). Nie mam również zastrzeżeń co do precyzji w formułowaniu zdań (błędy są incydentalne, np. w streszczeniu napisano o oligonukleotydzie DNA tworzącym 25 nt pętlę zamiast o 25 nt oligonukleotydzie DNA tworzącym pętlę). Kwestią dyskusyjną jest czy białko jest ekspresjonowane, czy ulega ekspresji. Rozprawa zawiera obszerny wykaz skrótów (również objaśnień), w którym

umieściłabym również molowy współczynnik absorpcji ϵ , TMAE, RCF, a skoro jest tutaj eIF4AIII, to również Barentsz mógłby być. Skrót NDM dotyczy zapewne mechanizmu degradacji transkryptów zawierających przedwczesny kodon terminacji translacji w mRNA (a nie obecności STOP w ogóle).

Podsumowanie.

W swojej rozprawie doktorskiej Pan Mateusz Wilamowski podjął się wyjaśnienia w jaki sposób białko MCP1P1 rozpoznaje unikalne matryce molekularne. Autor zrealizował cele pracy i wyciągnął właściwe wnioski. Wykazał się przy tym znajomością unikalnego warsztatu metodycznego. W mojej opinii rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, dokumentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Rozprawa doktorska spełnia więc warunki określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. z późniejszymi zmianami o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, wnoszę więc o dopuszczenie Pana Mateusza Wilamowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wiesława Widłak

prof. dr hab. Wiesława Widłak

Centrum Onkologii – Instytut

im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach