UNIWERSYTET IM. ADAMA MICKIEWICZA W POZNANIU
Wydział Biologii
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii

dr hab. Krzysztof Sobczak, profesor UAM w Poznaniu
Zakład Ekspresji Genów

Poznań, 8 stycznia 2019

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Mateusza Wilamowskiego zatytułowanej „Charakterystyka specyfiki degradacji transkryptów przez MCPIP1"

Niniejszą recenzję wykonałem jako osoba powołana do funkcji recenzenta przez Radę Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ. Oceny dokonałem według obowiązujących uregulowań prawnych na podstawie przekazanej mi rozprawy doktorskiej.

Praca doktorska mgr Mateusza Wilamowskiego została wykonana w Zakładzie Biochemii Ogólnej UJ w Krakowie pod opieką merytoryczną prof. dr hab. Jolanty Jury, pełniącej funkcję promotora w przewodzie doktorskim. W macierzystym zespole od wielu lat prowadzone są z dużym sukcesem badania nad rolą nukleazy MCPIP1 w regulacji metabolizmu RNA, jako ważnego elementu regulacji ekspresji wielu genów w różnych stanach fizjologicznych i patologicznych. Oceniana praca wpisuje się właśnie w ten nurt badań.

W komórkach różnych tkanek i w różnych warunkach środowiskowych pojedynczy gen może ulegać ekspresji na istotnie wyższym lub niższym poziomie. Ten niesłychanie ważny proces odbywa się na wielu poziomach począwszy od struktury chromatyny, na potranlacyjnej modyfikacji białek skończywszy, a jednym z istotnych jego elementów jest precyzyjna kontrola poziomu dojrzałych cząsteczek mRNA. Klasą ważnych graczy w tym procesie są endonukleazy, których aktywność znacząco wpływa na okres półtrwania docelowych mRNA, który może wynosić jedynie kilka minut lub aż kilkanaście godzin. Jednym z białek pełniących istotną rolę na tym poziomie regulacyjnym jest nukleaza MCPIP1, która stała się głównym przedmiotem badań opisanych w ocenianej rozprawie.

Praca doktorska mgr Mateusza Wilamowskiego składa się z trzech głównych części. Pierwszą stanowi, liczący 15 stron, wstęp omawiający istniejący stan wiedzy w zakresie wybranych mechanizmów degradacji RNA oraz struktury i funkcji białek z rodziny MCPIP. Część ta napisana jest w sposób kompetentny i informatywny, chociaż zabrakło w niej nieco szerszego kontekstu regulacji ekspresji genów oraz graficznego przedstawienia niektórych istotnych zagadnień. Następnie można zapoznać się z ogólnym celem badań i stosowaną metodyką, opisaną w sposób pozwalającej na odtworzenie przeprowadzonych eksperymentów. Trzecim elementem rozprawy jest drobiazgowy opis uzasadnienia, przeprowadzenia i interpretacji poszczególnych eksperymentów, który kończy rzetelne i obszerne przedyskutowanie uzyskanych wyników z dotychczasowym stanem wiedzy opisanym w literaturze naukowej. Na podkreślenie zasługuje wyważenie w zakresie interpretacji wyników, pokazujące na doskonałe zrozumienie ograniczeń poszczególnych metod badawczych.

ul. Umultowska 89, Cllegium Biologicum, 61-614 Poznań
NIP 777 00 06 350, REGON 000001293
tel. +48 61 829 59 50, fax. +48 61 829 59 49
ibmib@amu.edu.pl

www.ibmib.amu.edu.pl

Celem pierwszej części pracy było określenie specyfiki substratowej oraz kinetyki wiązania rekombinowanych białek MCPIP1 do RNA. W tym celu doktorant przeprowadził nadekspresję i oczyszczanie szeregu białek modelowych, włączając natywne białko $MCPIP1_{WT}$ oraz jego wariant niosący mutację w domenie katalitycznej $MCPIP1_{D141N}$. Nukleazowa aktywność tych białek została przebadana dla szeregu dobrze dobranych cząsteczek RNA i DNA. Okazało się, że $MCPIP1_{WT}$ wykazuje endonukleolityczną aktywność jedynie wobec substratowych RNA tworzących strukturę typu spinki do włosów, które są hydrolizowane w regionie pętli apikalnej. Co interesujące nie wykazuje przy tym większej specyfiki sekwencyjnej. W przypadku pojedynczo-niciowych cząsteczek RNA zarówno białko $MCPIP1_{WT}$ jak i nieoczekiwanie jego mutant uczestniczą w egzonukleolitycznym cięciu od strony 3'. Aktywność tą, choć w ograniczonym zakresie, wykazują oba białka również wobec substratowych RNA tworzących stabilne struktury typu spinki. Pomimo, że doktorant wykonał szereg eksperymentów kontrolnych (np. przedstawiony na Ryc. 5) rodzi się ciągle pytanie, czy aktywność egzonukleolityczna może pochodzić z jakiegoś białka bakteryjnego współoczyszczanego z pełnej długości MCPIP1, a ponadto, czy część cięć endonukleolitycznych (zwłaszcza tych drugo-rzędowych) nie może wynikać z obecności w roztworze jonów magnezu w stężeniu 2,5 mM, zwłaszcza, że reakcje prowadzone były aż 240 min. w temperaturze 37°C. Jeśli jednak założymy, że MCPIP1 i jego mutant wykazują aktywność egzonukleazy, to chciałbym prosić, aby doktorant spróbował zaproponować mechanizm tych niespecyficznych cięć, znając częściowo strukturalne podstawy oddziaływania tych białek z kwasami nukleinowymi (ostatnia część pracy) oraz wiedząc o polimorfizmie w zakresie homo-oligomeryzacji białek. Ponadto jakie znaczenie biologiczne można przypisać tej aktywności?

Bardzo ciekawe wyniki przyniosły również badania dysocjacji badanych białek z modelowymi cząsteczkami RNA i DNA. Pokazują one niewielką specyfikę substratową wiązania. Ponadto dowodzą, że fragment białka, obejmujący aminokwasy 134-297, pozbawiony palca cynkowego wykazuje wysokie powinowactwo do wszystkich testowanych kwasów nukleinowych. Rodzi się zatem kolejne pytanie, jak można wytłumaczyć zaledwie około 4-krotną różnicę w powinowactwie białka pełnej długości i jego fragmentów, a przede wszystkim jakie znaczenie mogą mieć uzyskane wyniki dla zrozumienia mechanizmu selektywnego działania MCPIP1 w komórkach? Pytanie to wydaje się zasadne zwłaszcza w kontekście wyników uzyskanych dla długich, naturalnych cząsteczek docelowych, które z jednej strony sugerują niską specyficzność wiązania RNA przez białko pełnej długości, a z drugiej strony pokazują brak zdolności wiązania z tymi samymi cząsteczkami RNA fragmentu $PIN\text{-}ZF_{D141N}$. Tutaj chciałbym również spytać, czy doktorant przetestował długie transkrypty kontrolne (nie będące naturalnymi cząsteczkami docelowymi dla MCPIP1) względem zdolności wiązania białka i/lub indukowanej przez nie hydrolizy wiązań fosfodiestrowych.

W kolejnej części pracy doktorant zadał pytanie o naturę oddziaływania między cząsteczkami białka MCPIP1. Uzyskane wyniki sugerują sekwencyjne wiązanie monomerów tego białka na substratowym RNA a następnie ich oligomeryzację, co zachęciło do analizy zdolności oligomeryzacji badanego białka. Okazało się, że aż 60% rekombinowanego białka MCPIP1 przy braku w środowisku cząsteczek RNA występuje w postaci dimeru, a jedynie niewielka część w postaci monomeru lub

ul. Umultowska 89, Cllegium Biologicum, 61-614 Poznań
NIP 777 00 06 350, REGON 000001293
tel. +48 61 829 59 50, fax. +48 61 829 59 49
ibmib@amu.edu.pl
www.ibmib.amu.edu.pl

tetrameru. Wynik ten jest bardzo ciekawy i elegancko udokumentowany, ale zastanawia mnie dlaczego nie wykonano podobnej analizy w obecności substratowego RNA, który może zmieniać relacje ilościowe tych form, czego częściowo dowodzą wyniki badań z zastosowaniem kriomikroskopii elektronowej.

Trzecim celem badawczym postawionym w rozprawie doktorskiej było określenie wysokorozdzielczej struktury tworzonej przez MCPIP1 i jego fragmenty. Analiza krystalograficzna doprowadziła do stworzenia wielu modelowych układów strukturalnych, z których najbardziej wartościowym wydaje się rozwiązanie struktury tetrameru domeny PIN_{D141N} z widocznym niewielkiej średnicy centralnym tunelem, który prawdopodobnie stanowi miejsce ulokowania kwasu nukleinowego. Ta część rozprawy stanowi raczej świetną podstawę do przeprowadzenia kolejnych badań, w tym próby krystalizacji i rozwiązania wysokorozdzielczej struktury pełnej długości MCPIP1 i wytłumaczeniu mechanizmu działania badanego białka.

Zawartość ocenianej rozprawy doktorskiej została już częściowo opublikowane w latach 2016-2018 w trzech pracach eksperymentalnych, w których przygotowaniu mgr Wilamowski pełnił istotną rolę. Wydaje się, że również badania strukturalne przeprowadzone przez doktoranta będą stanowiły w przyszłości część kolejnej pracy naukowej.

Z dogłębnej analizy wszystkich elementów rozprawy doktorskiej jasno wynika, że mgr Wilamowski w sposób dogłębny przestudiował zagadnienia dotyczące mechanizmów potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów, głównie w kontekście modulacji stabilności RNA. Chcąc jak najlepiej zrealizować założone cele, doktorant zaplanował logiczny ciąg poszczególnych etapów badań. Pokazał, że potrafi w sposób kompetentny skorzystać z rozmaitych, komplementarnych narzędzi badawczych, przynoszących wzajemnie uzupełniające się dane, interpretując przy tym w sposób właściwy uzyskane wyniki. Materiał eksperymentalny został klarownie przedstawiony na licznych rycinach. Tutaj jedyny mój zarzut dotyczy wielkości czcionki i znaczników na wykresach na rycinach 1-4 (zwłaszcza wykresy na Ryc. 2E-G, 3C-E, 4B oraz struktury modelowych RNA i DNA). Dyskusja obserwacji eksperymentalnych przeprowadzona została w kompleksowy, a zarazem bardzo wyważony sposób. W ogóle cała praca napisana jest w jasny i logiczny sposób, bez wdawania się w zbędne detale. Praca doktorska jest solidna i odpowiada na kilka ważnych pytań biologicznych. Wskazane powyżej uchybienia i wątpliwości interpretacyjne nie wpływają w istotny sposób na moją bardzo wysoką ocenę całości niniejszej rozprawy.

Wnioski końcowe

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa mgr Mateusza Wilamowskiego spełnia wszystkie warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2016 r. poz.882). Zapoznając się z rozprawą odczuwałem ogromną satysfakcję zetknięcia się z rzetelnie i kompleksowo prowadzonymi badaniami, które doprowadziły do sformułowania wielu konkluzji istotnych z

ul. Umultowska 89, Cllegium Biologicum, 61-614 Poznań
NIP 777 00 06 350, REGON 000001293
tel. +48 61 829 59 50, fax. +48 61 829 59 49
ibmib@amu.edu.pl
www.ibmib.amu.edu.pl

UNIWERSYTET IM. ADAMA MICKIEWICZA W POZNANIU
Wydział Biologii
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii

poznawczego punktu widzenia. Świadczy o tym nie tylko opinia recenzenta, ale również opinia recenzentów i redaktorów czasopism naukowych, jakimi są *PLOS One* (IF 2,766) i *Scientific Reports* (IF 4,122) i *Journal of Innate Immunity* (IF 4,147), w których doktorant wspólnie z kolegami z zespołu badawczego opublikował wyniki swoich badań. Dlatego też z całym przekonaniem zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ o dopuszczenie mgr Mateusza Wilamowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego i gorąco popieram wniosek o nadanie mu stopnia naukowego doktora.

Uważam jednocześnie, że oceniana praca ma zdecydowanie ponadprzeciętny charakter. Doktorant publikując swoje wyniki w międzynarodowych czasopismach naukowych dowiódł, że przeprowadzone przez niego badania mają duże znaczenie dla pogłębienia wiedzy w zakresie wielu aspektów potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów przez rybonukleazę MCPIP1. Zastosowana w rozprawie metodyka badawcza została dobrana w taki sposób, aby zrealizować postawione cele w sposób wyczerpujący. Doktorant wykazał się wielkimi zdolnościami w opanowaniu, ale i skutecznym zastosowaniu wielu technik badawczych, a uzyskane wyniki zinterpretował w sposób właściwy dojrzałym naukowcom. Zwracam się zatem do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ o rozważenie wyróżnienia ocenianej pracy doktorskiej stosowną nagrodą.

dr hab. Krzysztof Sobczak

ul. Umultowska 89, Cllegium Biologicum, 61-614 Poznań
NIP 777 00 06 350, REGON 000001293
tel. +48 61 829 59 50, fax. +48 61 829 59 49
ibmib@amu.edu.pl

www.ibmib.amu.edu.pl