



prof. dr hab. Artur Jarmołowski
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Zakład Ekspresji Genów
ul. Umultowska 89
61-614 Poznań
tel. 61-829-5959; fax 61-829-5949
e-mail: artjarmo@amu.edu.pl

Poznań, 02. 05. 2016

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Marcina Sajka pt. „Mechanizm
potranskrypcyjnej regulacji supresora nowotworowego *SIAH1* przez białka
PUMILIO i NANOS”**

Praca doktorska mgr Marcina Sajka została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Jadwigi Jaruzelskiej, w Instytucie Genetyki Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Promotorem pomocniczym ocenianej rozprawy jest dr Barbara Ginter-Matuszewska. Tematyka pracy mgr Marcina Sajka dotyczy ważnego etapu regulacji ekspresji genów, który polega na hamowaniu ekspresji określonych genów poprzez wiązanie się do syntetyzowanych na ich matrycy transkryptów swoistych białek rozpoznających rejony 3'UTR takich mRNA. Magister Marcin Sajka zajął się w swojej rozprawie dwoma takimi białkami, PUMILIO i NANOS, o których wiadomo, że odgrywają bardzo ważną rolę w regulacji genów związanych z różnicowaniem się komórek eukariotycznych. Związanie się obu tych białek z określonymi mRNA powoduje zahamowanie translacji powiązaną lub nie z degradacją docelowego mRNA. Temat ocenianej rozprawy jest ściśle związany z tematyką naukową uprawianą w zespole prof. dr hab. Jadwigi Jaruzelskiej, który od lat zajmuje się



badaniem procesów odpowiedzialnych za rozwój i prawidłowe funkcjonowanie męskich komórek generatywnych. Nie mam najmniejszych wątpliwości, że podjęty przez Doktoranta temat rozprawy jest ważny nie tylko z uwagi na jego czysto poznawczy charakter, ale także na możliwości wykorzystania uzyskanych wyników w diagnostyce i leczeniu niepłodności.

Przedstawiona do oceny rozprawa ma układ klasyczny. Rozpoczyna się obszernym, opartym na danych literaturowych wstępem, który został napisany bardzo jasno i rzeczowo. Podoba mi się przejrzysta i logiczna konstrukcja tej części pracy doktorskiej mgr Marcina Sajka, a przede wszystkim to, że przedstawione we wstępie informacje są dobrze dobrane i umożliwiają czytelnikowi, w tym wypadku recenzentowi, właściwą analizę przedstawionych w rozprawie wyników. Autor rozprawy wykorzystał do przygotowania tego doskonałego wprowadzenia najnowszą literaturę naukową. Zaprezentowany przez mgr Marcina Sajka przegląd danych literaturowych jest napisany ładnym językiem, w zasadzie wolnym od błędów stylistycznych i laboratoryjnego żargonu; jedynie w kilku miejscach zauważyłem drobne pomyłki i nieścisłości, które jednak nie utrudniły mi w najmniejszym stopniu zrozumienie tekstu. Przygotowany przez Doktoranta wstęp rozpoczyna się ogólnym omówieniem białek wiążących się z 3'UTR cząsteczek mRNA. W następnym podrozdziale tej części pracy doktorskiej mgr Marcin Sajek przywołuje także inne ważne negatywne regulatory działające potranskrypcyjnie, które również wiążą się do rejonów 3'UTR mRNA, określane jako mikroRNA (miRNA). W następnej części wprowadzenia literaturowego Autor przedstawił losy cząsteczek mRNA, do których przyłączyły się omawiane białka, wskazując na istotną rolę w procesie regulacji ekspresji genów nadzorowanej przez białka wiążące RNA, jak i miRNA, kompleksu deadenylującego CCR4-NOT. Magister Marcin Sajek omówił także w przygotowanym przez siebie wstępie koncepcję regulonów RNA, czyli grup mRNA posiadających w ich 3'UTRach takie same motywy sekwencyjne, i dlatego podlegających wspólnej

regulacji przez rozpoznające je białka. Najobszerniejszy fragment przygotowanej przez mgr Marcina Sajka części mającej charakter przeglądu literatury naukowej dotyczy oczywiście białek PUMILIO i NANOS. Znaleźć tutaj możemy szczegółowe wiadomości na temat oddziaływań PUMILIO z RNA, współdziałania PUMILIO z innymi białkami, w tym z białkami NANOS, w końcu przedstawiono w tej części listę docelowych mRNA regulowanych przez białka PUMILIO w komórkach człowieka.

Wstęp ocenianej pracy doktorskiej w naturalny sposób nawiązuje do kolejnego rozdziału rozprawy, w którym Doktorant opisuje cel, jaki przed sobą postawił w ramach pracy doktorskiej. Głównym celem mgr Marcina Sajka było zbadanie, w jaki sposób ekspresja supresora nowotworowego *SIAH1* podlega potranskrypcyjnej regulacji przez białka PUMILIO i NANOS w komórkach ludzkich. Wszystkie omówione w rozprawie doświadczenia zostały zaprojektowane i wykonane w celu zrealizowania tego głównego, jasno postawionego zadania badawczego.

Następny rozdział rozprawy opisuje użyte w badaniach odczynniki, a przede wszystkim metodykę przeprowadzonych eksperymentów i nie mam do tej części poważniejszych uwag. Chciałby w tym miejscu podkreślić, że metody badawcze zastosowane w pracy zostały prawidłowo dobrane do zadanych pytań naukowych. Wszystkie zastosowane przez Doktoranta techniki doświadczalne są w rozprawie precyzyjnie opisane; zamieszczone w rozdziale „Materiały i metody” opisy umożliwiły mi rzeczową analizę wykonanych przez mgr Marcina Sajka doświadczeń. Warto podkreślić doskonałe opanowanie przez Autora rozprawy metod bioinformatycznych służących do analizy struktur białek i ich kompleksów z RNA. Nie wątpię, że przygotowane i zawarte w manuskrypcie opisy metodyczne będą pomocne innym doktorantom Instytutu Genetyki PAN. Z doświadczenia wiem, że jest to najczęściej czytany i niezwykle krytycznie oceniany fragment wszystkich rozpraw doktorskich.



Najobszerniejszą część ocenianej pracy stanowi oczywiście omówienie wyników badań Doktoranta. Wszystkie opisane w rozprawie doktorskiej mgr Marcina Sajka rezultaty mają charakter doniesień oryginalnych, a ich dokumentacja nie budzi moich zastrzeżeń. Wśród wielu interesujących obserwacji przedstawionych w rozprawie, moim zdaniem, na szczególne podkreślenie zasługują:

- wykazanie, że w potranskrypcyjnej represji genu *SIAH1* bierze udział zarówno PUMILIO1, jak i PUMILIO2,
- wykazanie, że PUMILIO2 wymaga do wiązania mRNA *SIAH1* motywów PBE1-6, a wiązanie białka PUMILIO1 jest od nich niezależne,
- udowodnienie, że poszczególne białka NANOS regulują represję mRNA *SIAH1* wykorzystując odmienne mechanizmy działania,
- powiązanie mutacji w genach *NANOS*, które zostały wykryte u osób cierpiących na bezpłodność, z aktywnością zmutowanych białek w teście derepresji mRNA *SIAH1*,
- identyfikacja miRNA, które mogą uczestniczyć w regulacji mRNA *SIAH1*.

Uzyskane przez mgr Marcina Sajka wyniki zostały doskonale skonfrontowane z danymi literaturowymi w bardzo dobrze napisanym rozdziale zatytułowanym „Dyskusja”. Doktorant udowodnił w tej części rozprawy, że nie tylko zna prace innych autorów poświęcone białkom PUMILIO i NANOS, ale przede wszystkim potrafi krytycznie odnieść się do swoich własnych wyników badań. Ich interpretacja



dokonano przez mgr Marcina Sajka zasługują moim zdaniem na najwyższą ocenę. Dyskusja została przygotowana niezwykle profesjonalnie. Podoba mi się również zamieszczenie na końcu rozdziału pt. „Dyskusja” krótkiego podsumowania, a także dołączenie oddzielnego rozdziału, w którym mgr Marcin Sajka przedstawił najważniejsze wnioski wynikające z uzyskanych przez niego wyników.

Poniżej przedstawiam kilka moich spostrzeżeń i komentarzy dotyczących eksperymentalnej części pracy doktorskiej mgr Marcina Sajka.

1. Nie jestem do końca przekonany, czy komórki HEK293FT są dobrym modelem badań nad działaniem białek PUMILIO i NANOS. Czy nie lepiej od razu „zaatakować” linie wywodzące się z męskich komórek germinalnymi? W trakcie obrony chciałbym dowiedzieć się, dlaczego zastosowano tę a nie inną linię komórkową.
2. Zastosowane w pracy przeciwciała wydają się rozpoznawać, co wyraźnie widać w analizach typu western blot, także inne antygeny. W jaki sposób zidentyfikowano właściwy prążek? Jak wygląda specyficzność używanych przeciwciał podczas immunoprecypitacji kompleksów białko/RNA z ekstraktów komórkowego?
3. Przy immunoprecypitacji RNA (RIP) przeciwciałami anty-PUMILIO1 i anty-PUMILIO2 wykazano, że badane białka znajdują się w kompleksie z mRNA *SLAH1*. Czy sprawdzono, czy PUMILIO 1 znajduje się w kompleksach uzyskanych przy zastosowaniu przeciwciał PUMILIO 2 i *vice versa*. Czy w badanych immunoprecypitatach znajdowały się białka NANOS? Jeśli tak to które?

4. Czy w immunoprecypitatach anti-PUMILIO 1 i anti-PUMILIO 2 sprawdzono obecność innych mRNA docelowych?
5. W eksperymentach, w których wykorzystano gen reporterowy monitorowano poziom represji i derepresję mRNA lucyferazy przy nadekspresji lub wyłączeniu przy pomocy siRNA poszczególnych genów kodujących białka PUMILIO i NANOS. Czy w jakiś sposób sprawdzono/skontrolowano wiązanie się tych białek do 3'UTR reportera?
6. W opisie uzyskanych wyników mgr Marcin Sajko bardzo często używa określenia konstrukcja zamiast dużo częściej używanego, chociaż też niezręcznego, określenia konstrukt. Dla mnie wersja rodzaju męskiego, czyli ten konstrukt brzmi lepiej.

Przedstawione powyżej uwagi i spostrzeżenia nie wpływają na moją bardzo pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej mgr Marcina Sajka. Przedstawiono w niej szereg interesujących, nowych i ważnych dla nauki obserwacji. Zostały one w ocenianej pracy doktorskiej rzeczowo przedyskutowane w oparciu o dobrą znajomość danych literaturowych, a przedstawiona interpretacja wyników wykonanych doświadczeń nie budzi żadnych zastrzeżeń. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że mgr Marcin Sajek po raz pierwszy eksperymentalnie udowodnił, iż mRNA *SIAH1* podlega regulacji przez białka PUMILIO i NANOS. Pokazał również, że mechanizm działania poszczególnych białek NANOS różni się pod względem zaangażowania ich rejonu NIM.



UNIWERSYTET IM. ADAMA MICKIEWICZA W POZNANIU

Wydział Biologii
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii

Uważam, że oceniana rozprawa spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim. Dlatego przedkładam Radzie Naukowej Instytutu Genetyki PAN w Poznaniu wniosek o dopuszczenie mgr Marcina Sajka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A. Jarmołowski
prof. dr hab. Artur Jarmołowski