



POLSKA AKADEMIA NAUK

Prof. dr hab. Jan Barciszewski



INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ

ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań

tel.: centrala 61 852 85 03, sekretariat 61 852 89 19

fax: 61 852 05 32, e-mail: ibch@ibch.poznan.pl

REGON 000849327

NIP 777-00-02-062

e-mail: Jan.Barciszewski@ibch.poznan.pl

23.05.2016

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr Marcina Sajka

pt. „Mechanizm potranskrypcyjnej regulacji supresora nowotworowego SIAH1 przez białka PUMILIO i NONOS”

1. Tematyka rozprawy

Badania objęte rozprawą dotyczą analizy procesu rozpoznania i regulacji ekspresji informacyjnego RNA (mRNA) SIAH1 kodującego enzym E3 biorący udział w końcowym etapie kaskady ubiquitynacji. Ligaza ubiquityny (E3, EC 6.3.2.19) katalizuje przeniesienie ubiquityny z kompleksu koniugującego E2 i utworzenie kowalentnego wiązania z resztą lizyny docelowego białka na szlaku kontrolowanej degradacji (proteolizy). Jest to wiązanie izopeptydowe między zmodyfikowanym aminokwasem (lizyna) tego białka i resztą glicyny przy końcu karboksylowym ubiquityny. Tak zmodyfikowany (ubiquitynowany) peptyd jest rozpoznawany przez proteasom 23S. Poza tą funkcją ubiquityna bierze udział także w regulacji transkrypcji i translokacji białek błonowych do endosomów. Ubiquityna zawierająca 76 aminokwasów o masie całkowitej 8.5 kDa zmienia strukturę histonów i ich oddziaływanie z innymi białkami chromatyny oraz z DNA. Konsekwencją ubiquitynacji są zmiany struktury przestrzennej DNA, stymulacja metylacji DNA, ekspozycji odcinków promotorowych oraz zaburzenia ekspresji genów.

Warto przypomnieć, że o szybkości degradacji ubiquitynowanego białka decyduje jego skład aminokwasowy przy końcu aminowym, co zostało zapamiętane i zapisane w historii, jako Reguła końca N zaproponowana przez Alexandra Varshavskiego w 1986, a za wyjaśnienie mechanizmu procesu ubiquitynacji Irwin Rose, Avram Herszko i Aaron Ciechanover otrzymali Nagrodę Nobla w 2004. Nie tylko dlatego, ale również z tych powodów problematyka ta jest niezwykle ciekawa. Podjęcie tematu regulacji ekspresji mRNA SIAH1 na poziomie translacji z udziałem białek PUMILIO i NANOS dodatkowo uzasadnia obserwacja, że gen *SIAH1* jest homologiem genu *sina* uczestniczącego w rozwoju oka oraz gametogenezie u *Drosophila melanogaster*. Ponadto SIAH1 odgrywa kluczową rolę w procesie spermatogenezy u myszy a także jest supresorem nowotworów.

Rozprawa doktorska dotyczy bardzo ważnego zagadnienia regulacji ekspresji genów, które analizowano na poziomie oddziaływań białek PUMILIO będącymi potranskrypcyjnymi modulatorami ekspresji genów oraz białek NANOS z informacyjnym RNA. Eksperymenty wykonane w ramach tej pracy oraz uzyskane wyniki dobrze współgrają z badaniami innych autorów, którzy pokazali, że białko wiążące RNA homologiczne do PUMILIO umieszczone w komórce może wizualizować i monitorować określony RNA oraz kontrolować jego aktywność.

Podsumowując, ciekawa problematyka, aktualne wyzwanie z perspektywnymi konsekwencjami.

2. Główne cele pracy

- 2.1. Wykazanie, że białka PUMILIO i NANOS biorą udział w regulacji ekspresji mRNA SIAH1 i są do tego procesu niezbędne.
- 2.2. Analiza zależności między strukturą i właściwą sekwencją nukleotydową RNA przy końcu 3' nie ulegającą translacji (3'UTR) a ekspresją mRNA SIAH1.
- 2.3. Identyfikacja domen strukturalnych białek NANOS kluczowych dla ekspresji SIAH1 mRNA.
- 2.4. Ocena potencjału regulacji ekspresji SIAH1 mRNA przy pomocy mikroRNA.

3. Główne wyniki badań objętych rozprawą

- 3.1. Wykazano jednoznacznie, że ekspresja mRNA SIAH1 jest zależna od białek PUMILIO i NANOS.
- 3.2. Białka SIAH1, PUMILIO 1 i 2, NANOS 1 i 3, ale nie NANOS 2, stanowiące główny teatr badań autora, występują w linii komórkowej nerki HEK293FT, wykorzystanym jako model badawczy.
- 3.3. Wykazano wzbogacenie mRNA SIAH1 w immunoprecypitatach z anty-PUMILIO 1 (11x) oraz z anty-PUMILIO 2 (6x).
- 3.4. PUMILIO 2 oddziałuje z NANOS 3 podczas represji ekspresji lucyferazy i 3'UTR mRNA SIAH1.
- 3.5. Na podstawie analizy oddziaływań PUMILIO 2 z PBE 2-6 z 3' UTR SIAH1 zidentyfikowanych w czasie modelowania molekularnego (dokowania), które pozwala na znalezienie położenia i konformacji w miejscu wiążącym a także na ocenę energii

swobodnej wiązania (entalpii) ΔG i obliczenie stałej powinowactwa K_a , doktorant pokazał, że PUF PUMILIO 2 wiąże się z PBE 2-6 swoiście dla każdego motywu.

- 3.6. Delecja motywów PBE 2-6 z 3'UTR mRNA SIAH1 nie powoduje derepresji przez białka PUMILIO 1-2.
- 3.7. Opracowano modele domeny palców cynkowych białka NANOS.
- 3.8. Wyselekcjonowano mikroRNA tworzące kompleksy z anty-PUMILIO 2 wśród których znajduje się 12 potencjalnych miejsc rozpoznania w 3'UTR SIAH 1, co wskazuje na prawdopodobieństwo ich udziału w represji mRNA SIAH1.
- 3.9. Wykazano, że paralogi PUMILIO i NANOS oddziałują z mRNA SIAH1 według odmiennych mechanizmów, wykazując dużą plastyczność.

4. Uwagi do pracy doktorskiej

- 4.1. W rozdziale wyniki autor stwierdza, że białka wyselekcjonowane do badań w rozprawie doktorskiej SIAH1, PUMILIO 1 i 2, NANOS 1 i 3 występują w komórkach nerki HEK293FT, przywołując nieopublikowane dane innych autorów z analizy testów wykorzystujących technikę Western blot i swoiste przeciwciała. Powstaje pytanie, czy Rycina 1 jest oryginalnym wynikiem własnym doktoranta, czy też powtórzeniem obserwacji innych autorów?
- 4.2. Wyniki modelowania molekularnego oddziaływania PUF PUMILIO 2 z PBE 2-6 omawiane są z nadmiernym optymizmem. Trudno bez zastrzeżeń przyjmować wielokrotne, jednoznaczne stwierdzenia autora odnośnie swoistości poszczególnych oddziaływań nukleozydów z aminokwasami, szczególnie wówczas, gdy informacje na rycinach np. 6, 9, 10 i 12 nie są dobrze widoczne.
- 4.3. Doktorant na podstawie wyników modelowania stwierdza, że PUF PUMILIO 2 wiąże się odmiennie dla każdego z motywów PBE 2-6. Jest to konsekwencja lokalizacji poszczególnych nukleotydów w sekwencji względem poszczególnych aminokwasów. Czy rzeczywiście jest to jedyna przesłanka dla swoistych oddziaływań indywidualnych elementów?
- 4.4. Opisując oddziaływania poszczególnych nukleozydów z białkowymi elementami wiążącymi, autor używa określenia oddziaływania warstwowe np. z tyrozyną, co można zrozumieć oraz z asparaginą lub arginina, co nie jest oczywiste.

- 4.5. Omawiając rozpoznanie G5 w PBE5 autor zauważył znaczne różnice między strukturą *in silico* oraz w kryształach, odsyłając czytelnika do Ryciny 5, która jest mało czytelna i wymaga wyjaśnienia.
- 4.6. W Tabeli 1 (Wyniki) autor pokazuje sekwencje zachowawcze wiążące się do motywów PBE 2-6 oraz wyniki modelowania molekularnego. Dobrze byłoby połączyć te obserwacje z mało widocznymi danymi strukturalnymi na Rycinie 6.
- 4.7. Doktorant podkreśla znaczenie obserwacji *in silico* oddziaływania G5 z aminokwasami powtórzenia 4 w PBE5 poprzez krawędź cukrową, które są inne w przypadku struktury krystalograficznej. Nadawanie kluczowego znaczenia tym oddziaływaniom bez dodatkowych eksperymentów nie jest w pełni uzasadnione.
- 4.8. Dyskusja oddziaływania PBE4 z domeną PUF wskazuje, że autor przykłada duże znaczenie sekwencji „klasycznego” lub rozszerzonego” motywu. Ponadto stwierdza, że obserwowane są odstępstwa od klasycznej reguły rozpoznania jednego nukleotydu przez 3 aminokwasy w danym powtórzeniu. Stwierdzenie klasyczna reguła nie jest uzasadniona. Może to być tylko propozycją.
- 4.9. Podczas dyskusji oddziaływań PBE4 autor zauważa nieścisłość, która wg niego może wynikać z zastosowanej procedury dokowania i przywołuje swoje nieopublikowane prace. Wydaje się, że jest to kluczowy moment w analizie badanych oddziaływań i nie można pozostawiać czytelnika bez kompletnych informacji. Dotyczy to także analizy wiązania motywu zachowawczego w testach retardacji żelowej, gdzie autor przywołuje dane nieopublikowane innych autorów, zamiast prezentować własne. Przywoływanie nieopublikowanych danych (kilkakrotnie w rozprawie) uniemożliwia pełną i wnikliwą analizę przedstawionych wyników.
- 4.10. Na rycinie przedstawiającej przyrównanie fragmentów sekwencji 3'UTR SIAH1 RNA widoczne są sekwencje DNA.
- 4.11. Czy autor zastanawiał się nad weryfikacją eksperymentalną poprawności struktury palców cynkowych (Ryc. 24)?

5. Wniosek końcowy

Praca doktorska mgr Marcina Sajka jest bardzo rzetelnym materiałem naukowym dotyczącym badań oddziaływań kwas rybonukleinowy-białko. Jest dobrym przykładem szerokiego wykorzystania bioinformatyki w biologii molekularnej i biologii komórki w biochemii.

Rozprawa stanowi istotny wkład do badań a także do wiedzy o sposobach kontroli oddziaływania między kwasem nukleinowym a białkiem. Jest to solidna praca biochemiczna.

Stwierdzam, że oceniana praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu o dopuszczenia p. mgr Marcina Sajka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę aktualność i złożoność mechanizmów rozpoznawania białka i RNA a także zaproponowane przez doktoranta różne sposoby zrozumienia i rozwiązania tego problemu skłoniły mnie do zaproponowania przyznania doktorantowi wyróżnienia za pracę, uzyskane wyniki i ich autorską interpretację.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Jawor', with a stylized, flowing script.