prof. dr hab. Artur Jarmołowski
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Zakład Ekspresji Genów
ul. Umultowska 89
61-614 Poznań
tel.: +48 61-829-5959; faks: +48 61-829-5949
e-mail: artjarmo@amu.edu.pl

Poznań, 25. 09. 2014

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Aleksandra Tworaka pt.:
„Otrzymywanie i charakterystyka białek typu Dicer pochodzących z modelowej rośliny bobowej *Medicago truncatula*"

W pracowni prof. dr hab. Marka Figlerowicza od wielu lat prowadzi się intensywne badania nad udziałem małych RNA w regulacji ekspresji genów u roślin. Warto przypomnieć, że to właśnie prof. dr hab. Marek Figlerowicz był jednym z pierwszych naukowców w Polsce, który zauważył niezwykłą wagę tego typu regulacji u roślin i rozpoczął intensywne badania nad potranskrypcyjną regulacją ekspresji genów. Rozprawa doktorska mgr Aleksandra Tworaka powstała w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu. Promotorem ocenianej pracy jest prof. dr hab. Marek Figlerowicz, zaś funkcję promotora pomocniczego w tym przewodzie pełni dr Anna Urbanowicz. Przedstawiona do recenzji rozprawa dotyczy enzymów, które uczestniczą w biogenezie małych cząsteczek RNA w komórkach roślinnych. Te intrygujące nukleazy, należące do ewolucyjnie silnie zachowawczej rodziny RNaz typu III, występują powszechnie u grzybów, roślin i zwierząt. U roślin nukleazy biorące udział w biogenezie małych, regulatorowych cząsteczek RNA znane są jako białka DCL (ang. *Dicer-like*), z uwagi na ich podobieństwo do występującej u zwierząt rybonukleazy Dicer, która jest odpowiedzialna za produkcję siRNA, a także bierze udział, wraz z innym enzymem należącym do tej rodziny znanym jako Drosha, w biogenezie mikroRNA (miRNA). W genomie *Arabidopsis thaliana* zidentyfikowano cztery białka typy DCL: AtDCL1, AtDCL2, AtDCL3 i AtDCL4. Każdy z tych enzymów spełnia w komórce określoną funkcję. Chociaż wiemy coraz więcej na temat ich specyficzności substratowej, a także znamy procesy w których poszczególne enzymy

DCL uczestniczą, nie rozumiemy, jaki jest mechanizm tej specyficzności. Dlatego właśnie mgr Aleksander Tworak postanowił w swojej rozprawie scharakteryzować enzymy DCL występujące w *Medicago truncatula*. Z uwagi na dość skąpe informacje dotyczące właściwie wszystkich roślinnych endorybonukleaz typu Dicer, temat ten uważam za oryginalny i wart zainteresowania. Po zapoznaniu się z wynikami opisanymi w rozprawie trochę tajemniczy pozostaje dla mnie wybór obiektu badań, czyli *Medicago*. Czy badania prowadzone przez Doktoranta były częścią większego projektu badawczego prowadzonego na tym gatunku? A może chodziło o wstępną charakterystykę biogenezy małych regulatorowych RNA, a właściwym celem było badanie ich udziału w procesie asymilacji azotu przez bakterie symbiotyczne z grupy *Rhizobium*? Na obronie chciałbym prosić o wyjaśnienie, skąd zainteresowanie właśnie tym a nie innym gatunkiem rośliny.

Oceniana rozprawa została napisana w języku polskim i ma klasyczny układ. Autor przygotował pracę doktorską niezwykle starannie, wszystkie jej części są napisane nie tylko poprawnym, ale ładnym językiem polskim, w zasadzie wolnym od poważniejszych błędów gramatycznych i stylistycznych, nie ma w niej również nadmiaru panoszących się obecnie powszechnie określeń żargonowych. Oczywiście, w każdej pracy można znaleźć drobne niedociągnięcia, jednak na tle innych rozpraw doktorskich, które ostatnio recenzowałem, praca mgr Aleksandra Tworaka wypada naprawdę dobrze.

Przedstawiona do oceny praca rozpoczyna się przejrzyście i ze swadą napisanym wstępem, w którym Autor zapoznaje nas z podstawowymi informacjami na temat małych regulatorowych RNA oraz ich udziałem w regulacji ekspresji genów u roślin, a także scharakteryzował uczestniczące w powstawaniu tych krótkich cząsteczek RNA enzymy, czyli białka DCL. Cały wstęp został przez Doktoranta przygotowany bardzo starannie, na podstawie wielu oryginalnych, aktualnych, często gorących jeszcze, dopiero co opublikowanych artykułów naukowych. Jest napisany jasno i bardzo dobrze się go czyta. Co więcej, został tak opracowany, że zawiera wszystkie informacje, które potrzebne są przy interpretacji przedstawionych w dalszych rozdziałach pracy wyników. Napisany przez mgr Aleksandra Tworaka wstęp doskonale wprowadza czytelnika w temat rozprawy i ułatwia zrozumienie danych przedstawionych w dalszych częściach pracy.

W następnym rozdziale ocenianej rozprawy Doktorant przedstawił założenia swojej pracy doktorskiej. Głównym celem doktoratu mgr Aleksandra Tworaka była identyfikacja, a następnie molekularna charakterystyka genów kodujących enzymy typu Dicer u *Medicago*. Autor rozprawy postawił przed sobą również niezwykle trudne zadanie wyprodukowania rekombinowanych enzymów DCL i sprawdzenia w układzie *in vitro* ich aktywności oraz specyficzności substratowej. Zadanie otrzymania i analizy biochemicznej rekombinowanych białek DCL było przedsięwzięciem trudnym, a co za tym idzie wysoce ryzykownym, ponieważ nie od dziś w środowisku naukowców badających biogenezę małych RNA wiadomo, że bardzo trudno jest wyprodukować enzymy DCL w *E. coli*. Cel pracy został sformułowany jasno i precyzyjnie. Był on, o czym przekonałem się studiując pozostałe rozdziały rozprawy, bardzo konsekwentnie przez mgr Aleksandra Tworaka realizowany. Jedynym moim zastrzeżeniem do tej części pracy jest to, że cel otrzymania i zbadania rekombinowanych białek DCL nie został przedstawiony w bardziej ogólnym kontekście, jako próba odpowiedzi na jakieś zasadnicze pytanie biologiczne, na przykład, jak przekłada się struktura poszczególnych enzymów DCL na ich specyficzność substratową. Oczywiście recenzent potrafi sobie taki długofalowy cel dopowiedzieć, ale czytelnik nie wprowadzony bliżej w opisywaną tematykę badawczą już niekoniecznie.

W następnym rozdziale swojej pracy doktorskiej mgr Aleksander Tworak opisał metodykę wykonanych doświadczeń i analiz komputerowych, oraz podał źródła poszczególnych wykorzystywanych przez niego materiałów. Przedstawione opisy wydają mi się wystarczająco precyzyjne, aby według nich powtórzyć wszystkie przedstawione w ocenianej rozprawie doświadczenia i analizy. Właściwie nie mam do tej części poważniejszych zastrzeżeń. To czy w opisach metod nie ma błędów, okaże się jednak dopiero w przyszłości, kiedy koleżanki i koledzy mgr Aleksandra Tworaka zaczną intensywnie wykorzystywać przygotowane przez niego protokoły w swoich własnych badaniach. Z doświadczenia wiem, że ta część wszystkich rozpraw doktorskich jest najczęściej wykorzystywana, i jak żadna inna podlega, można by nawet rzec brutalnej weryfikacji. Sądzę, że w przypadku doktoratu mgr Aleksandra Tworaka osoby korzystające z przygotowanych przez niego protokołów będą w pełni usatysfakcjonowani. Mnie osobiście zamieszczone w omawianym rozdziale opisy umożliwiły precyzyjną analizę wszystkich wykonanych przez Autora rozprawy eksperymentów.

Najważniejszą częścią każdej rozprawy stanowi oczywiście rozdział poświęcony uzyskanym przez Doktoranta wynikom. Magister Aleksander Tworak rozpoczął swoje prace od komputerowej analizy danych pochodzących z sekwencjonowania genomu *Medicago truncatula*, i wyszukał w nich geny kodujące białka homologiczne do białek DCL z *A. thaliana* i *Glycine max*. W wyniku takiej analizy *in silico* zidentyfikowano sześć *loci* kodujących białka DCL w genomie *Medicago*. Dla trzech z nich, a dokładnie mówiąc *MtDCL1, MtDCL2 i MtDCL3*, przynależność do poszczególnej grupy (czyli DCL1, 2, 3 i 4) została już określona przy składaniu genomu *Medicago*. Jednak dla trzech genów zidentyfikowanych przez Doktoranta nie było żadnych informacji, jakie rodzaje białek DCL kodują. W wyniku przyrównania do czterech białek DCL z rzodkiewnika mgr Aleksander Tworak wykazał, że te nowe *loci* kodują: MtDCL4 i dwa warianty DCL2, a mianowicie MtDCL2b i MtDCL2c, przy czym gen kodujący MtDCL2b odpowiadał za syntezę białka pełnej długości, zaś *MtDCL2c* białka skróconego. Dla przejrzystości nazewnictwa scharakteryzowany wcześniej gen MtDCL2 został przez Doktoranta nazwany MtDCL2a. Drugim zadaniem, które zrealizował mgr Aleksander Tworak było ustalenie profilu ekspresji wszystkich zidentyfikowanych przez niego genów *DCL* w wybranych organach i stadiach rozwojowych. Doktorant wykazał, że wszystkie badane geny są aktywne transkrypcyjnie i ulegają ekspresji. Co więcej, ekspresja ta pojawiała się we wszystkich analizowanych organach rośliny we wszystkich przebadanych stanach rozwojowych. Ustalono, że zawsze najwyższy był poziom transkrypcji genu *MtDCL1*, a najniższy *MtDCL2b* i *MtDCL2c*. Ciekawe jednak, że podwyższony poziom ekspresji badanych enzymów charakteryzował brodawkę korzeniową, w tym najwyższą różnicę między brodawką a innymi organami zaobserwowano dla *MtDCL2b*. Obserwacje te wskazują jednoznacznie na rolę enzymów grupy Dicer w tworzeniu brodawki i/lub w kontrolowaniu zachodzących w niej procesów metabolicznych. Charakteryzując transkrypty genu *DCL1* wykazano, że jego produkt ulega alternatywnemu składaniu. To alternatywne zdarzenie splicingowe polega nie wycinaniu intronu 14, co powoduje pojawienie się przedwczesnego kodonu STOP. Wariant ten Doktorant nazwał *MtDCL1-AS*. Podobna izoforma została opisana u *A. thaliana*. Ponieważ u rzodkiewnika wariant z zachowanym intronem jest prekursorem mikroRNA 838 (miR838), mgr Aleksander Tworak poszukiwał podobnej cząsteczki pochodzącej z intronu 14 genu DCL1 z *Medicago*, niestety bez rezultatu. Niepowodzeniem zakończyły się także próby

znalezienia produktów rozcięcia mRNA MtDCL1-AS metodą RACE. Czy próbowano jednak znaleźć tę hipotetyczną cząsteczkę miRNA poprzez zastosowanie głębokiego sekwencjonowania frakcji niskocząsteczkowych RNA z *Medicago truncatula*? Wydaje się bardzo prawdopodobne, że taka cząsteczka miRNA jednak powstaje. Po identyfikacji genów *DCL* i scharakteryzowaniu ich ekspresji, Doktorant przystąpił do najtrudniejszego zadania, jakim niewątpliwie było otrzymanie rekombinowanych enzymów DCL. Pierwsze próby otrzymania białek MtDCL1 i MtDCL2a w systemie prokariotycznym zakończyły się porażką. Zdecydowano się zatem na nadekspresję białek skróconych. Wzorcem do takiego skracania obu enzymów byłą struktura jedynego białka DCL o dokładnie poznanej strukturze przestrzennej, enzymu z *Giardia intestinalis*. Białko to posiadając aktywność katalityczną Dicera, zbudowane jest jedynie z domeny PAZ i domeny RNazy III. Autor rozprawy przygotował konstrukty do ekspresji MtDCL1 i MtDCL2a składających się jedynie z katalitycznego trzonu, czyli domeny PAZ, dwóch domen RNazy III oraz natywnego końca karboksylowego, obejmującego jedną (w przypadku MtDCL1) lub dwie (w przypadku MtDCL2a) domeny dsRBD odpowiedzialne za wiązanie się enzymu do dwuniciowych RNA. W tym przypadku osiągnięto zamierzony cel i otrzymano rekombinowane rdzenie katalityczne endorybonukleaz DCL1 i DCL2 z *Medicago*. Następnym krokiem było sprawdzenie, czy otrzymane rekombinowane białka są aktywne katalitycznie. Dla porównania zastosowano dostępne komercyjnie enzymy DCL1 z *Homo sapiens* i *Giardia intestinalis*. W eksperymentach zastosowano szereg znakowanych radioaktywnie substratów w postaci różnych cząsteczek RNA. Udowodniono, że otrzymane enzymy posiadają aktywność katalityczną, chociaż nie zaobserwowano specyficzności substratowej DCL1 i DCL2. Muszę przyznać, że doświadczenie to budzi moje wątpliwości z uwagi na brak kontroli negatywnej w postaci cząsteczek, które z uwagi na swoją strukturę nie mogą być substratami dla badanych enzymów. W przypadku badania miejsc cięcia katalizowanych przez oba analizowane białka DCL, przydałoby się przetestować kilka wariantów substratów z mutacjami zaburzającymi strukturę spinki, ponieważ tylko wtedy można jednoznacznie stwierdzić, jaki wpływ na aktywność katalityczną ma dana struktura RNA. A może wykonano takie eksperymenty tylko ich nie opisano? Chciałbym również usłyszeć na obronie, jakie są dalsze plany Doktoranta badania enzymów DCL z *Medicago*.

Wszystkie opisane w rozprawie wyniki naukowe zostały bardzo wnikliwie skonfrontowane z danymi opublikowanymi wcześniej przez innych badaczy, w interesującym i obszernym rozdziale zatytułowanym Dyskusja. Przedstawiona tam żywa polemika oparta jest na najnowszej literaturze naukowej. Przyznam, że czytałem ją z dużym zainteresowaniem. Tuż za Dyskusją Doktorant zamieścił króciutki rozdział pod tytułem Wnioski, w którym wypunktował najważniejsze wyniki zamieszczone w rozprawie doktorskiej. Ocenianą pracę doktorską kończy streszczenie przygotowane w języku polskim i angielskim, obszerny (211 pozycji) spis bibliograficzny, a także załączniki z danymi sekwencyjnymi.

Rozprawę doktorską mgr Aleksandra Tworaka oceniam bardzo pozytywnie. Autor przedstawił w niej oryginalne wyniki naukowe, które mają duże znaczenie w zrozumieniu roli nukleaz DCL w biogenezie małych RNA. Wykonane badania dostarczyły także cennych informacji o ewolucji tej grupy białek u roślin. Oceniana praca w pełni spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim. Zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu o dopuszczenie mgr Aleksandra Tworaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A. Jarmołowski

prof. dr hab. Artur Jarmołowski