

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

Poznań, 04. 04. 2017

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Konrada Deleńko pt. „Charakterystyka metabolizmu RNA podczas odróżnicowania komórek mezofilowych *Arabidopsis thaliana*”

Oceniana praca doktorska powstała w Zakładzie Biologii Komórki na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Promotorem rozprawy jest dr hab. Janusz Niedojadło. Temat pracy doktorskiej mgr Konrada Deleńko dotyczy niezwykle interesującego zjawiska odróżnicowania komórek mezofilowych liści podczas usuwania ich ścian komórkowych, czyli otrzymywania protoplastów, oraz ponownego różnicowania się uzyskanych z protoplastów komórek potomnych, aż do powstania całych roślin. Paradoksalnie, proces ten, powszechnie wykorzystywany od dziesiątków lat w biotechnologii roślin, nie został do tej pory precyzyjnie opisany molekularnie, można nawet zaryzykować stwierdzenie, że nadal nie rozumiemy, jaki jest molekularny mechanizm nabywania przez protoplast totipotencji. Z tego względu uważam, że podjęty przez Doktoranta temat jest bez żadnych wątpliwości oryginalny i nowatorski, a jego realizacja z założenia mogła dostarczyć nowych wartościowych informacji, co jest wymogiem każdej rozprawy doktorskiej. Już teraz, na początku mojej recenzji, stwierdzam, że mgr Konrad Deleńko przedstawił w swojej dysertacji ważne i istotne wyniki, które na pewno zainteresują innych naukowców zajmujących się podobną tematyką naukową. Warto w tym miejscu również podkreślić, że zaprezentowane w rozprawie wyniki mają nie tylko znaczenie czysto poznawcze, ale również mogą posłużyć do usprawnienia procesu regeneracji roślin z protoplastów, co w przypadku niektórych gatunków roślin nadal nastrocza trudności.

Oceniana rozprawa została napisana w języku polskim i ma klasyczny układ. Autor przygotował swoją pracę doktorską starannie i rzetelnie, wszystkie części rozprawy mgr Konrada Deteńko zostały napisane poprawnym, wolnym od poważniejszych błędów gramatycznych i stylistycznych językiem. W kilku miejscach Autor nie ustrzegł się, co prawda, określeń żargonowych, nie jest to jednak nagminne i absolutnie nie stanowiło przeszkody w interpretacji opisanych wyników.

Przedstawiona mi do oceny praca rozpoczyna się przejrzystym napisanym wstępem, który Autor podzielił na dwie wyraźnie wyodrębnione części: pierwszą mgr Konrad Deteńko poświęcił przedstawieniu ogólnych informacji na temat ekspresji genów kodujących białka, natomiast w drugiej części zajął się szczegółowym omówieniem jednego ze sposobów regulacji ekspresji genów - regulacji kierowanej przez cząsteczki mikroRNA (miRNA). Obie części zostały przygotowane bardzo profesjonalnie. Autor podczas pisania tego obszernego rozdziału wykorzystał najnowszą literaturę naukową. Magister Konrad Deteńko skonstruował wstęp do rozprawy doktorskiej w sposób jasny i zrozumiały dla czytelnika – przyznam, że czytałem przygotowany przez Autora przegląd literaturowy z wielką przyjemnością. Pewien niedosyt pozostawiły jedynie fragmenty dotyczące odróżnicowywania się i procesów różnicowania komórek, które powinny być, moim zdaniem, w tekście bardziej wyeksponowane, a nie zepchnięte na koniec części wstępnej. Chodzi mi przede wszystkim o procesy związane z przebudową struktury chromatyny, które wydają się kluczowe przy przeprogramowaniu losu komórki. Chociaż cały wstęp jest sensownie powiązany z dalszymi rozdziałami rozprawy, byłoby lepiej, gdyby fragmenty bezpośrednio dotyczące tematyki doktoratu były bardziej wyeksponowane i przewijały się przez wszystkie części przygotowanego przez Autora omówienia literaturowego. Ta uwaga może przydać się Doktorantowi, jeśli zechce wykorzystać tę część doktoratu do przygotowania na jego podstawie pracy przeglądowej.

W kolejnym rozdziale ocenianej rozprawy mgr Konrad Deteńko przedstawił dwa główne cele swojej pracy, czyli:

1. Poznanie i porównanie poziomów aktywności transkrypcyjnej genomu, ze szczególnym uwzględnieniem aktywności polimerazy RNA II, na kolejnych etapach odróżnicowania komórki.

2. Określenie roli, jaką pełnią w procesie odróżnicowania cząsteczki miRNA – kluczowe regulatory ekspresji genów u eukariontów.

Cele badawcze w ocenianej rozprawie zostały sformułowane bardzo precyzyjnie i zostały przez Doktoranta w pełni osiągnięte. Zadanie, jakie postawił przed sobą mgr Konrad Deteńko było bardzo ambitne, ale możliwe do wykonania w ramach doktoratu.

W rozdziale Materiały i Metody ocenianej rozprawy mgr Konrad Deteńko opisał metodykę wykonanych doświadczeń i analiz, a także podał źródła poszczególnych wykorzystywanych przez niego odczynników i innych materiałów badawczych. Zamieszczone w pracy opisy wydają mi się wystarczająco precyzyjne, aby według nich powtórzyć wszystkie przedstawione w ocenianej rozprawie doświadczenia. Nie mam do tej części poważniejszych zastrzeżeń. Chciałbym jednak podkreślić w tym miejscu, że mgr Konrad Deteńko wykorzystał do uzyskania zaprezentowanych w pracy wyników cały wachlarz skomplikowanych i nowatorskich technik badawczych. Na szczególne podkreślenie zasługuje doskonały mariaż metod mikroskopowych, co nie dziwi z uwagi na doświadczenie i wcześniejsze zainteresowania naukowe Promotora rozprawy - dr hab. Janusza Niedojadło, z nowoczesnymi technikami badania aktywności transkrypcyjnej na poziomie całego genomu, poprzez wykorzystanie technik sekwencjonowania nowej generacji (NGS). Wielkie brawa dla Doktoranta, że nie przestraszył się trudności, i w taki idealny sposób połączył techniki obrazowania z wyszukanyimi metodami molekularnymi. Uznanie należy się także Promotorowi ocenianej pracy doktorskiej za determinację w ciągłym budowaniu nowoczesnego warsztatu badawczego, opartego zarówno na mikroskopii, jak i biologii molekularnej. Obecnie tylko takie połączenie gwarantuje prawdziwy sukces naukowy.

Najważniejszy fragment każdej rozprawy doktorskiej stanowi oczywiście część poświęcona uzyskanym przez Doktoranta wynikom. Magister Konrad Deteńko rozpoczął swoją „walkę” z ambitnym tematem różnicowania i odróżnicowania komórek roślinnych od

ustalenia najlepszej procedury otrzymywania i regeneracji protoplastów pochodzących z mezofilu liści *A. thaliana*. Te ważne badania wstępne pozwoliły wybrać optymalną dla zaplanowanych doświadczeń metodę otrzymywania protoplastów, a także warunki propagacji komórek z nich uzyskanych. Na podstawie wykonanych doświadczeń Doktorant ustalił, że w badaniach wykorzystywane będą protoplasty oraz komórkach z nich pochodzące po 24, 72 i 120 godzinach hodowli.

Magister Konrad Deleńko zbadał na początku dystrybucję polimerazy RNA II w formie elongacyjnej, czyli takiej, w której seryna 2 domeny CTD polimerazy (ang. *C-terminal domain*) jest ufosforylowana. Uzyskane wyniki jednoznacznie pokazały, że pomimo występującej w protoplastach dekondensacji chromatyny, obserwowanej wcześniej przez wielu innych badaczy, poziom transkrypcji prowadzonej przez polimerazę RNA II wyraźnie się obniża. Ciekawe jednak, że w tym okresie nie obserwowano obniżenia, a nawet zaobserwowano pewną akumulację mRNA w jądrze komórkowym. Można zatem przypuszczać, że w czasie odróżnicowania dochodzi do wyłączenia ekspresji większości genów, przy jednoczesnym zahamowaniu eksportu mRNA do cytoplazmy. Nie wyklucza to oczywiście, że w tym czasie ulega silnej ekspresji kilka genów, których produkty są kluczowe dla procesu odróżnicowania. Zgadzam się z wnioskiem wysnutym przez Autora rozprawy, że przyczyną akumulacji polyadenylowanych cząsteczek RNA w jądrze komórkowym może być zahamowanie procesu wycinania intronów z pre-mRNA, a, jak wiadomo z innych źródeł, większość transkryptów pierwotnych, które wciąż posiadają introny podlega ścisłej retencji w jądrze komórkowej. Ten powszechnie działający mechanizm gwarantuje, że żadne cząsteczki, które mogłyby stać się nieprawidłowymi matrycami w czasie translacji nie trafią do cytoplazmy. Nie jest jednak w pracy jasne, co dzieje się później z tymi zatrzymanymi w jądrze cząsteczkami: ulegają degradacji, czy też w odpowiednim czasie ulegają splicingowi i zostają wyeksportowane do cytoplazmy. Ta druga możliwość jest dużo bardziej ciekawa i warto byłoby zweryfikować hipotezę czasowego zatrzymania procesu wycinania intronów. Podczas obrony chciałbym dowiedzieć się, czy wykonano jakieś dodatkowe eksperymenty, których wyniki wyjaśniłyby ten intrygujący problem. Wykonane przez mgr Konrada Deleńko doświadczenia lokalizacji czynnika SC35 i snRNA nie przyniosły jasnej odpowiedzi, czy obserwowana retencja mRNA w jądrze ma związek ze zmianą położenia czynników zaangażowanych w wycinanie intronów: w przypadku snRNA zaobserwowano co prawda w protoplastach skupiska snRNA o trómetylowanym kopie, ale już lokalizacja białka SC35 nie zmieniała się wyraźnie w

protoplastach w porównaniu do komórkach mezofilowych. Czy spróbowano w takiej sytuacji zlokalizować inne czynniki splicingowe? Czy sprawdzono jak przebiega splicing endogennych pre-mRNA? Przy sugerowaniu nowym hipotez trzeba jednak pamiętać, że transfekowane protoplasty otrzymane z komórek pochodzących liści tytoniu i rzodkiewnika są powszechnie wykorzystywane do badania splicingu, co może oznaczać, że spliceosomy pracują w protoplastach prawidłowo. A zatem obserwowana akumulacja poly(A) RNA może mieć bardziej związek z zahamowanym eksportem cząsteczek RNA z jądra komórkowego do cytoplazmy przez blokowanie działania eksportyn niż z samym splicingiem.

W czasie odróżnicowania komórek Autor rozprawy zauważył także, że z cytoplazmy usuwane są mRNA i rRNA. O ile usuwanie mRNA z cytoplazmy w czasie odróżnicowania ma głęboki sens biologiczny, gdyż przy zmianie profilu ekspresji genów należy usunąć jak najszybciej z cytoplazmy mRNA, z których mogą być produkowane niewłaściwe dla protoplastów białka, sens usuwania rybosomów nie jest już tak oczywisty. Czy to oznacza, że do przeprogramowania komórki potrzebne są inne rybosomy niż te, które działają w komórkach mezofilowych? Na obronie chciałbym dowiedzieć się, jakie na ten temat zdanie ma mgr Konrad Dębeńko. Studiując ocenianą pracę doktorską pomyślałem także, że powinno się wykonać podobne do przedstawionych w dysertacji eksperymenty w tle mutantów kontroli jakości i degradacji RNA, między innymi w mutantach rybonukleaz XRN. Będą to doskonałe doświadczenia łączące bezpośrednio procesy degradacji i kontroli jakości RNA z odróżnicowaniem komórki.

Warto zwrócić uwagę na jeszcze jeden interesujący wynik opisany w ocenianej rozprawie doktorskiej. Magister Konrad Dębeńko zauważył mianowicie, że zmiana struktury chromatyny obserwowana w protoplastach nie ma związku ze zmianami stopnia zależnej od siRNA metylacji DNA, ponieważ, jak wykazał Doktorant eksperymentalnie, dystrybucja AGO4, istotnego białka tego procesu nie zmienia się w protoplastach w porównaniu do komórek liścia *A. thaliana*. Warto też podkreślić, że Autor rozprawy pokazał, że AGO1, kluczowy element kompleksu RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*), występuje również w jądrze komórkowym, a nie tylko w cytoplazmie, gdzie działają miRNA. Ta obserwacja otwiera zupełnie nowe możliwości badania dodatkowych, nieznanych jeszcze funkcji AGO1 w tym kompartmentcie komórkowym. W ostatnich dwóch, trzech latach opublikowano kilka ważnych prac wskazujących na specjalne jądrowe funkcje AGO1. Dotyczą one jednak

komórek ludzkich i zwierzęcych. Zdecydowanie namawiam do rozpoczęcie intensywnych badań nad tym tematem.

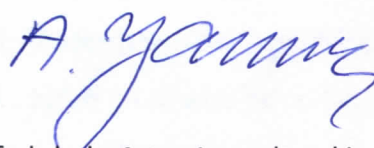
Magister Konrad Deleńko wykazał także w swojej pracy doktorskiej, że prawidłowa aktywność endorybonukleazy DCL1 istotna jest w procesie proliferacji komórek pochodzących od zregenerowanych protoplastów. W badaniach tych Doktorant wykorzystał mutantą *dcl1-9*. Czy Autor rozprawy użył także innych mutantów biogenezy miRNA, które potwierdziłyby istotną rolę miRNA w analizowanym procesie? Byłoby dobrze porównać wyniki otrzymane w różnych mutantach, co dałoby dużo bardziej solidne podstawy do postawionego wniosku. Muszę tutaj podkreślić, że uważam zastosowane podejście, czyli analizę procesu odróżnicowania w mutantach *A. thaliana* za właściwie i dające wiele doskonałych wyników. Co więcej, czuję niedosyt użycia mutantów podczas realizacji doktoratu mgr Konrada Deleńko. Mam nadzieję, że w dalszych badaniach zespołu kierowanego przez dr hab. Janusza Niedojadło częściej będą wykorzystywane odpowiednie mutanty *A. thaliana*.

Udział miRNA w procesach odróżnicowania i różnicowania komórek badany był również poprzez globalną, całogenomową analizę ekspresji miRNA. Tak jak już wspomniałem, jestem pod wrażeniem odwagi Doktoranta i Promotora przy zastosowaniu najnowocześniejszych metod sekwencjonowania RNA do poznania profilu ekspresji wszystkich cząsteczek miRNA, czyli określenia tak zwanego mikrotranskryptomu. Chciałbym pochwalić Doktoranta nie tylko za wykonanie takich doświadczeń, ale przede wszystkim za świetną ich analizę. Zaprezentowane wyniki i ich doskonałe omówienie w rozdziale Dyskusja zasługują na szczególną pochwałę. Dane uzyskane z sekwencjonowania jasno wykazały, że miRNA pełnią ważną rolę w kontroli odróżnicowania komórek mezofilowych. Magister Konrad Deleńko udowodnił również, że istotny udział w tym procesie mają: stres oksydacyjny (miR398), szlaki związane z działaniem auksyn (miR390a i miR390b), a także mechanizmy utrzymywania totipotencji, które odpowiedzialne są za hamowanie różnicowania się komórek (miR396a-3p i miR164). Autor rozprawy wykazał także, że ważną rolę w odróżnicowaniu komórek roślinnych odgrywają miR319 i miR396, które regulują cykl komórkowy, umożliwiając w odpowiednim czasie rozpoczęcie podziałów komórkowych. Rola miR319 została dodatkowo potwierdzona w bardzo eleganckim eksperymencie, w którym wykorzystano mutantą *miR319b*. Na podstawie przedstawionych wyników można

powiedzieć zatem, że kontrola ekspresji genów *MIR319*, *MIR390* i *MIR398* zdaje się być kluczowa w procesie odróżnicowania komórek roślinnych.

Wszystkie opisane w rozprawie wyniki naukowe zostały przez mgr Konrada Dedeńko bardzo wnikliwie skonfrontowane z danymi opublikowanymi wcześniej przez innych badaczy. Przedstawiona tam polemika oparta została na najnowszej literaturze naukowej. Przyznam, że czytałem ją z dużym zainteresowaniem. Tuż za Dyskusją Doktorant zamieścił krótki, niespełna dwustronicowy rozdział, w którym pokusił się o wyciągnięcie wniosków płynących z wykonanych przez siebie doświadczeń. To bardzo dobry zwyczaj, niestety nie tak częsty w rozprawach doktorskich, które kończą się zwykle jedynie prostym podsumowaniem lub listą uzyskanych wyników, a nie zawierają żadnych oryginalnych wniosków.

Rozprawę doktorską mgr Konrada Dedeńko oceniam bardzo pozytywnie. Autor przedstawił w niej oryginalne wyniki naukowe, które mają duże znaczenie w zrozumieniu mechanizmów różnicowania i odróżnicowania komórek roślinnych. Oceniana praca w pełni spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim. Zwracam się do Rady Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie mgr Konrada Dedeńko do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie z uwagi na wysoki poziom uzyskanych wyników, a także fakt, że część uzyskanych przez Doktoranta rezultatów została już opublikowana w interesującym artykule naukowym, w której mgr Konrad Dedeńko jest pierwszym autorem, zwracam się do Wysokiej Rady z wnioskiem o wyróżnienie ocenianej przeze mnie rozprawy.



prof. dr hab. Artur Jarmołowski