



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, 08. 04. 2018

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Malwiny Hyjek pt. „Kanoniczne białka Sm jako część cytoplazmatycznego kompleksu mRNP – nowa rola korowych białek spliceosomu u roślin”

I. Uwagi ogólne

Praca doktorska mgr Malwiny Hyjek została wykonana pod kierunkiem dr hab. Dariusza Smolińskiego, w Zakładzie Biologii Komórki Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Mikołaja Kopernika (UMK) w Toruniu. Promotorem pomocniczym ocenianej rozprawy jest dr Agnieszka Kołowerzo-Lubnau. Tematyka pracy mgr Malwiny Hyjek dotyczy konserwatywnej grupy białek określanych jako białka Sm, opisanych zarówno wśród grzybów, roślin, jak i zwierząt. Białka o podobnej budowie działają również w komórkach bakteryjnych. Białka Sm to małe polipeptydy o masie od 9 do 29 kDa, tworzące większe kompleksy białkowe o charakterystycznej strukturze przypominającej pierścień. Najlepiej poznaną funkcją białek Sm jest ich udział, wraz z kilkoma jądrowymi niskocząsteczkowymi RNA (snRNA), w procesie wycinania intronów z pierwotnych transkryptów genów kodujących białka (pre-mRNA). Splicing pre-mRNA, czyli proces usuwania sekwencji



niekodujących i łączenia odcinków kodujących – egzonów w zdatny do translacji dojrzały mRNA zachodzi w jądrze komórkowym, stąd też głównie jądrowa lokalizacja białek Sm w komórkach eukariotycznych. Należy jednak pamiętać, że białka Sm transportowane są z cytoplazmy, gdzie powstają, do jądra komórkowego, gdzie zachodzi splicing, w postaci uformowanych już cząstek rybonukleoproteinowych zwanych w skrócie snRNP. To właśnie cytoplazma jest miejscem składania heptamerycznego pierścienia białek Sm i łączenia go z cząsteczkami U1, U2, U4 i U5 snRNA. Wykazano, że przyłączenie białek Sm do snRNA w cytoplazmie jest niezbędne dla swoistej modyfikacji 5' końców tych RNA, polegającej na dołączeniu dwóch dodatkowych grup metylowych do oryginalnej czapeczki, jaką otrzymują wszystkie transkrypty RNA polimerazy II w trakcie transkrypcji. Taka modyfikacja zabezpiecza cząsteczki snRNA przed rozpoznaniem przez rybosom i jednocześnie jest niezbędna dla importu gotowych cząstek snRNP z cytoplazmy do jądra komórkowego. Od bodaj dekady pojawia się coraz więcej informacji sugerujących poza splicingowe funkcje kanonicznych polipeptydów Sm w komórkach eukariotycznych. Te bardzo interesujące obserwacje pochodzą prawie wyłącznie z doświadczeń prowadzonych na komórkach zwierzęcych. Badania wykonane wcześniej w Zakładzie Biologii Komórki wykazały istnienie w cytoplazmie komórek roślinnych skupisk białek Sm i cząsteczek poli(A)RNA. Magister Malwina Hyjek, wspierana przez swojego promotora, podjęła się trudnego zadania scharakteryzowania tych cytoplazmatycznych skupisk białek Sm i RNA. Należy podkreślić, że brak jest doniesień literaturowych na temat obecności ciał jądrowych tego typu w komórkach roślinnych. Głównym celem rozprawy było poznanie, jakie cząsteczki RNA są częścią obserwowanych struktur, a także jakie dodatkowe białka mogą one zawierać. Co więcej, Doktorantka postanowiła sprawdzić dynamikę pojawiania się i zanikania takich zawierających białka Sm struktur cytoplazmatycznych. Dodatkowo, mgr Malwina Hyjek postawiła przed sobą najtrudniejsze zadanie polegające na stwierdzeniu, czy obserwowane skupiska



białek Sm i mRNA są miejscami obróbki RNA, regulacji translacji, czy też są związane z degradacją gromadzonych w nich cząsteczek RNA. W badaniach wykorzystano oryginalny model badawczy, mikrosporocyty modrzewia europejskiego w trakcie diplotenu profazy I podziału mejotycznego, system bardzo dobrze „rozpracowany” metodycznie w Zakładzie Biologii Komórki UMK. Cel ocenianej rozprawy był bardzo ambitny, a uzyskane wyniki są w pełni oryginalne i ciekawe. Spełniony został zatem wymóg nowatorstwa badań prowadzonych przez mgr Malwinę Hyjek. Z punktu widzenia tematyki, wyboru obiektu badań oraz postawionego problemu badawczego oceniana rozprawa jest wzorcowa.

Warto podkreślić, że w trakcie studiów doktoranckich mgr Malwina Hyjek opublikowała trzy prace eksperymentalne i dwie przeglądownki. Prace eksperymentalne ukazały się w: *International Journal of Hyperthermia*, *Journal of Experimental Botany*, *Plant Cell Reports*, a obie przeglądownki w *Postęпах Biologii Komórki*. W pracy, która ukazała się w *Journal of Experimental Botany* Doktorantka jest pierwszym autorem. Wszystkie publikacje zostały oparte na dodatkowych, nie ujętych w ocenianej rozprawie doktorskiej wynikach naukowych. Przedstawiona do oceny rozprawa ma klasyczny układ, została napisana w języku polskim, właściwie bez błędów i laboratoryjnego żargonu. Wstęp i Dyskusja ocenianej pracy doktorskiej zostały opracowane przez mgr Malwinę Hyjek na podstawie licznych pozycji literaturowych.

Stwierdzam, że praca doktorska mgr Malwiny Hyjek w pełni spełnia warunki formalne stawiane rozprawom doktorskim, zarówno pod względem formy, jak i oryginalności tematu oraz poziomu naukowego uzyskanych wyników.

II. Ocena merytoryczna

Magister Malwina Hyjek, wykorzystując metody immunofluorescencyjne i fluorescencyjną hybrydyzację *in situ* (FISH), wykazała, że podczas diplotenu profazy

w mikrosporocytach modrzewia w cytoplazmie akumulują się w określonych miejscach białka Sm oraz poli(A) RNA. Określono wielkość obserwowanych kulistych struktur o wielkości od 0,5 do 1 μm . W badaniach wykorzystano trzy różne przeciwciała rozpoznające białka Sm; wszystkie testowane przeciwciała jednoznacznie wskazywały na istnienie struktur cytoplazmatycznych zawierających poli(A)RNA i białka Sm. Struktury te wykryto także w półcienkich skrawkach z pylników modrzewia. Dodatkowo, wykorzystano mikroskopię elektronową oraz przeciwciała znakowane cząstkami złota do potwierdzenia obecności opisanych przez Doktorantkę ciał na poziomie ultrastrukturalnym. Strukturom tym nadano nazwę ciał Sm/poli(A). Ponieważ ciała te mogłyby być miejscami tworzenia kompleksów snRNA, wykonano doświadczenie, które wykazać miało, czy w badanych strukturach znajdują się cząsteczki snRNA. W żadnym analizowanym przypadku, nie zaobserwowano obecności snRNA w ciałach Sm/poli(A). Doktorantka nie zaobserwowała także nakładania się sygnałów pochodzących od przeciwciał rozpoznających charakterystyczną dla spliceosomowych snRNA czapeczkę 3mG, a także nie stwierdziła obecności w badanych strukturach białka U2B², ważnego składnika snRNP U2. Eksperymenty te pokazały, że ciała Sm/poli(A) nie są tożsame z opisanymi wcześniej przez zespół prof. Dariusza Smolińskiego ciałami CsBs. Analizując wyniki tych doświadczeń, nasunęło mi się pytanie, dlaczego na wykonanych zdjęciach nie widzimy ciał CsBs? Przecież zastosowano przeciwciała rozpoznające białka Sm i sondy hybrydujące do cząsteczek snRNA. W trakcie obrony prosiłbym o wyjaśnienie tej niejasności. Magister Malwina Hyjek wykonała również interesującą analizę dynamiki pojawiania się badanych ciał cytoplazmatycznych podczas pojedynczego cyklu syntezy RNA w mikrosporocycie. Wykazano, że ciała Sm/poli(A) widoczne są w stadiach od III do VII. Zaobserwowano, że w stadiach, w których identyfikowano dużą liczbę ciał Sm/poli(A) aktywność transkrypcyjna była mniejsza niż w stadiach, w których ciał takich nie było. Zaproponowano, że badane struktury występują w okresach o obniżonej aktywności



transkrypcyjnej. Oprócz znakomitych analiz mikroskopowych mgr Malwina Hyjek zamieściła w swojej rozprawie wyniki sekwencjonowania cząsteczek RNA po wytrąceniu kompleksów Sm/RNA z frakcji cytoplazmatycznej komórek pylników modrzewia. Z uwagi na nietypowy materiał, Doktorantka zmuszona była samodzielnie opracować metodę frakcjonowania komórek oraz określić warunki samej immunoprecypitacji. Wykonano bardzo dobre doświadczenia kontrolne. Wybrano najlepsze do immunoprecypitacji przeciwciało. Sprawdzono jego skuteczność poprzez badanie poziomu białek Sm i snRNA U1. Ciekawe, że w puli wytrąconych białek Sm nie było SmG. Czy wynikało to tylko z problemów technicznych, czy też w ciałach Sm/poli(A) nie ma tego polipeptydu? Szkoda, że nie wykonano równoległe podobnej reakcji immunoprecypitacji kompleksów snRNP z frakcji jądrowej. Porównanie wyników pochodzących z frakcji jądrowej i cytoplazmatycznej pomogłoby stwierdzić, czy ciała Sm/poli(A) zawierają wszystkie kanoniczne białka Sm. Magister Malwina Hyjek wyizolowała następnie RNA z cytoplazmatycznych kompleksów Sm/RNA, przygotowała odpowiednie biblioteki i zsekwenowała, wykorzystując sekwenator MiSeq firmy Illumina. Przeprowadzona analiza bioinformatyczna uzyskanych danych wykazała obecność sekwencji cząsteczek mRNA. Przypisano im głównie rolę w odpowiedzi rośliny na różnorodne bodźce, produkty przez nie kodowane powiązane były także z translacją oraz fotosyntezą. Klasyfikacja tych mRNA pod kątem lokalizacji w komórce wykazała wzbogacenie w mRNA białek błonowych, plastydowych, mitochondrialnych i rybosomowych. Jeśli podzielono analizowane mRNA ze względu na funkcje kodowanych przez nie białek, zaobserwowano mRNA dla białek wiążących jony, nukleotydy i nukleozydy, a także kwasy nukleinowe. Dla kilku z tych mRNA przygotowano sondy, które wykorzystano dla potwierdzenia ich obecności w ciałach Sm/poli(A). Potwierdzono, że testowane mRNA gromadzą się w badanych strukturach. Wybrano także dwanaście mRNA, których nie obserwowano wśród cząsteczek oddziałujących z białkami Sm w cytoplazmie. Co ciekawe, jedenaście z




nich również znaleziono w badanych strukturach cytoplazmatycznych. Moim zdaniem może to wynikać z dość płytkiego sekwencjonowania bibliotek przy użyciu sekwenatora MiSeq. Może lepiej byłoby sekwencjonować uzyskane biblioteki głębiej, stosując inny aparat firmy Illumina? Magister Malwina Hyjek podjęła również próbę identyfikacji białek występujących w ciałach Sm/poli(A) poza polipeptydami Sm. Wykonana immunoprecypitacja białek Sm z frakcji cytoplazmatycznej komórek pylników i analiza wytrąconych kompleksów metodą spektrometrii mas wykazała obecność 118 białek, w tym oczywiście białka Sm, chociaż nie wszystkie. Znaczną część cytoplazmatycznego interaktomu białek Sm stanowiły białka związane z rybosomami i translacją, syntetazy tRNA, oraz białka powiązane z plastydami i fotosyntezą, a także mitochondriami. Zidentyfikowano także białka wiążące RNA. Co ciekawe, wśród białek tworzących kompleksy z cytoplazmatyczną pulą polipeptydów Sm były także markery ciał P i granul stresowych. Sugeruje to możliwą komunikację pomiędzy opisywanymi przez Doktorantkę ciałami Sm/poli(A) i innymi strukturami cytoplazmatycznymi. Jednocześnie wykluczono, że ciała Sm/poli(A) zawierają białka związane z degradacją RNA i regulacją translacji. Podczas trwania diplotenu profazy I w mikrosporocytach dochodzi do 5 cykli syntezy i obróbki poli(A)RNA. Dynamika tworzenia się i zanikania ciał Sm/poli(A) w cytoplazmie jest podobny dla pierwszych czterech cykli. Magister Malwina Hyjek odkryła jednak, że w ostatnim piątym cyklu aktywności transkrypcyjnej, a dokładniej w jego stadium VII, dochodzi do utworzenia dużych cytoplazmatycznych struktur zawierających białka Sm, ale bez mRNA. Doktorantka wykazała, że w stadium tym dochodzi do akumulacji w cytoplazmatycznych ciałach zawierających polipeptydy Sm rybosomów. Z czystej ciekawości chciałbym zapytać, czy podczas cykli aktywności transkrypcyjnej w mikrosporocytów dochodzi do syntezy zupełnie różnych mRNA, czy ich pula w poszczególnych cyklach jest podobna?



Przedstawione w rozprawie mgr Malwiny Hyjek wyniki stanowią pierwszą analizę cytoplazmatycznych kompleksów Sm/mRNA u roślin. Na podstawie uzyskanych danych Doktorantka zasugerowała, że gromadzenie się mRNA w cytoplazmatycznych ciałach zawierających białka Sm stanowi jeden z mechanizmów czasowej retencji specyficznych transkryptów w komórkach o cyklicznej, pulsacyjnej aktywności transkrypcyjnej. Poziom naukowy rozprawy jest bardzo wysoki. Uzyskane dane są poprawnie zinterpretowane i skonfrontowane z danymi literaturowymi.

III. Wnioski końcowe

Rozprawę doktorską mgr Malwiny Hyjek oceniam bardzo wysoko. Autorka przedstawiła w niej oryginalne i interesujące wyniki naukowe. Oceniana praca spełnia z nawiązką wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim. Dlatego zwracam się do Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UMK w Toruniu o dopuszczenie mgr Malwiny Hyjek do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, z uwagi na wyjątkowo wysoki poziom zaprezentowanych w rozprawie wyników oraz oryginalność podjętego tematu badawczego wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Malwiny Hyjek.


prof. dr hab. Artur Jarmołowski