



nencki institute
of experimental biology

POLSKA AKADEMIA NAUK
INSTYTUT BIOLOGII DOŚWIADCZALNEJ
im. M. NENCKIEGO

prof. dr hab. Grzegorz M. Wilczyński

Kierownik Pracowni Neuromorfologii Molekularnej i Systemowej
Instytut Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa
tel./fax: 5892355, e-mail: gwilcz@nencki.gov.pl

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

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa jest wybitną obserwacją nowych struktur cytoplazmatycznych zawierających rybonukleoproteiny, których rola, według powszechnej opinii, była dotychczas wiązana głównie z ich funkcją jądrową. Autorka zaobserwowała występowanie cytoplazmatycznych skupisk bogatych zarówno w białka Sm, jak i poliadenylowany RNA (poli(A) RNA) w mikrosporocytach modrzewia. Co więcej mgr Hyjek podjęła się zbadania funkcji i znaczenia tych struktur dla badanych komórek. W tym celu zweryfikowała hipotezę dotyczącą obecności kanonicznych białek Sm w cytoplazmatycznym kompleksie mRNP (ang. *messenger ribonucleoprotein*) i ich roli w potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów u roślin. W szczególności, Autorka postanowiła zidentyfikować transkrypty mRNA wchodzące w skład wyżej wymienionych kompleksów; ponadto p. Hyjek zbadła korelację pomiędzy transkrypcją zachodzącą w komórkach modrzewia, a dynamiką tworzenia i zanikania ciał cytoplazmatycznych zawierających białka Sm oraz poli(A). Co więcej Autorka podjęła się funkcjonalnej analizy ciał Sm/poli(A) pod względem regulacji translacji. Powyższe badania plasują się w głównym nurcie współczesnej cytologii i cytogenetyki, która daleko wykracza poza klasyczne odkrycia rutynowej mikroskopii elektronowej. Nowość uzyskanych informacji dowodzi, że zarówno natura zagadnienia, jak i zastosowana strategia badawcza są jak najbardziej trafne.

Wstęp rozprawy jest wyczerpujący, co stanowi znaczną pomoc dla recenzenta, dla którego badania cytoplazmatycznych kompleksów RNA nie należą do obszaru

głównych zainteresowań naukowych. Odnoszę jednak wrażenie, że miejscami wstęp zbyt dogłębnie opisuje badane zjawiska, jak na standardy rozprawy doktorskiej. Niemniej jednak, wśród opisywanych białek zabrakło mi wzmianki dotyczącej np. składników hnRNP (ang. *heterogenous ribonucleoproteins*) czy też białek kompleksu exon-junction towarzyszących transkryptom poprzez całą drogę wiodącą z jądra do cytoplazmy. Wstęp jest ilustrowany dwiema rycinami przedstawiającymi podjęte problemy badawcze w sposób jasny i uproszczony.

Część rozprawy dotycząca stosowanych przez Autorkę materiałów i metod opisana jest wzorcowo, z dokładnością wystarczającą do powtórzenia eksperymentów. Ustrzegła się ona powszechnych grzechów zarówno niewystarczającej, jak i nadmiernej szczegółowości, dbając o sedno sprawy. Mam jednak uwagę odnośnie zastosowanej kontroli immunofluorescencji: zalecałbym użycie przede wszystkim przeciwciała pochodzącego od zwierzęcia nie immunizowanego (ang. *non immune antibody*), ponieważ obecnie produkowane przeciwciała wtórne wykazują wysoką specyficzność. Moim zdaniem większość reakcji fałszywie pozytywnych pochodzi od niespecyficznego wiązania przeciwciała pierwszorzędowego, zatem samo jego pominięcie może prowadzić do błędnej interpretacji wyników.

W rozdziale opisującym wyniki szczególną przyjemność, jako morfologowi, sprawiły mi przedstawione zdjęcia uzyskane przy pomocy mikroskopii świetlnej i elektronowej. Wyniki te pokazują w sposób nie budzący wątpliwości kolokalizację granul zawierających białka Sm ze strukturami bogatymi w poli(A) RNA. Z równą morfologiczną precyzją udowodniono, że badane struktury to nie snRNP (ang. *small nuclear ribonucleoproteins*). Na szczególną uwagę zasługuje fakt, iż analizy immunofluorescencyjne, wykonano nie tylko na wyizolowanych protoplastach, ale również w skrawkach półcienkich z materiału zatopionego w żywicy BMM.

Analiza wizualna została wsparta poprzez użycie rozległej gamy metod ilościowych pozwalających zmierzyć stopień kolokalizacji (wtyczka JACoP w programie ImageJ). Ze swojej strony zasugerowałbym użycie ulepszonej, bardziej stabilnej wersji programu ImageJ w postaci platformy Fiji. Badania na poziomie mikroskopii świetlnej zostały uzupełnione o analizę ultrastrukturalną, w tym przy użyciu techniki immunogold.

Badania morfologiczne wykazały również znaczną dynamikę tworzenia i zanikania ciał Sm/poli(A) RNA korespondującą z kolejnymi etapami syntezy i obróbki poliadenylowanych transkryptów oraz ogólnej aktywności transkrypcyjnej w komórce.

Ogromne wrażenie zrobiły na mnie, jako na osobie nie będącej biochemikiem,

zastosowane techniki pozwalające stwierdzić, że zawarte w badanych ciałach poli(A) RNA to w istocie mRNA oraz prowadzące do identyfikacji tychże cząsteczek mRNA.

Dyskusja jest w rozprawie p. Hyjek również mocnym elementem, dowodzącym jej erudycji i dojrzałości naukowej. Przedstawione perspektywy badawcze są logiczną konsekwencją wyników rozprawy doktorskiej i wydają mi się bardzo ciekawe.

Podsumowując, w mojej ocenie praca spełnia wszelkie wymagania stawiane dysertacjom doktorskim i wnoszę o dopuszczenie jej Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na wagę uzyskanych wyników, ich nowatorskość, doskonałość metodyczną, a także rozmach i wyobraźnię Autorki proponuję też wyróżnienie rozprawy.



Grzegorz Wilczyński