



Prof. dr hab. Piotr P. Stępień
UNIwersytet Warszawski
Instytut Genetyki i
Biotechnologii

ul. Pawińskiego 5A
02-106 Warszawa
tel. (22) 659-2240
fax. (22) 658-4176
email: stepien@ibb.waw.pl

16 sierpnia 2016

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Macech-Klickiej pt. "Identyfikacja RNA wiązanych przez ludzkie białko HAX-1 z użyciem metody CRAC"

Mija ponad piętnaście lat od ustalenia pełnej sekwencji ludzkiego genomu, i wciąż jesteśmy bardzo daleko od zrozumienia wszystkich aspektów jego działania. Jedną z podstawowych trudności, na jakie napotyka współczesna biologia molekularna, jest mnogość produktów białkowych jakie mogą powstać z jednego genu oraz wielość interakcji białko-białko i białko-RNA jakie mogą zachodzić w różnych przedziałach komórki. Ostatnia dekada przyniosła wiele danych na temat nieoczekiwanej obecności wielu białek na przykład w mitochondriach, gdzie pomimo braku sekwencji sygnałowej, w określonych stanach fizjologicznych znaleziono takie białka jak telomeraza, Argonaute czy TP53.

Ten skomplikowany obraz wędrówek białek pełniących różne funkcje w zależności od miejsca w komórce i interakcji z różnymi partnerami stanowi wyzwanie dla badaczy pragnących ustalić rolę danego genu. W Instytucie Onkologii w Warszawie pod kierunkiem prof. dr hab. Janusza Siedleckiego i prof. dr hab. Ewy Grzybowskiej od wielu lat prowadzone są prace nad ludzkim białkiem HAX-1.

Białko HAX-1 zostało wykryte jako interaktor HS-1 czyli białka specyficznego dla komórek hematopoetycznych będącego substratem kinazy Src. HAX-1 jest partnerem wielu innych białek, i lokalizuje się w wielu przedziałach komórkowych: w błonie jądrowej, w retikulum cytoplazmatycznym, w mitochondriach, a także, co udowodnili badacze z Centrum Onkologii w Warszawie - w granulach gromadzących RNA (tzw. p-bodies). Tak więc białko HAX-1 jest wielofunkcyjne i uczestniczy w wielu procesach komórkowych takich jak apoptoza, migracja komórek, endocytoza, metastaza komórek nowotworowych i metabolizm RNA. Zwiększona ekspresja genu HAX-1 była obserwowana w różnych guzach litych, jak m. in, nowotworach okrężnicy, płuc, piersi i raku kolczystokomórkowym skóry. W przypadku tego ostatniego nowotworu ekspresja HAX-1 indukowała inwazyjność i oporność na chemioterapię. Z kolei hamowanie apoptozy przez HAX-1 wydaje się być związane z interakcją tego białka ze szlakiem sygnałowym białka Grb7. Delecja HAX-1 u myszy powoduje silną redukcję limfocytów w szpiku i śledzionie, bardzo rzadko występujące mutacje u człowieka związane są z neutropenią w tzw. zespole Kostmanna.

Z powyższych powodów zajęcie się dalszą charakterystyką białka HAX-1 było w pełni uzasadnionym celem badawczym. Doktorantka postanowiła uznać za punkt wyjścia ważne odkrycie zespołu prof. Ewy Grzybowskiej, lokalizujące białko HAX-1 w ciałkach p, gromadzących RNA. Ponadto dane literaturowe wskazywały na wiązanie HAX-1 do dwóch transkryptów: RNA kodującego wimentynę i RNA kodującego beta polimeraz DNA. Doktorantka postawiła interesującą hipotezę, że wyżej wymienione transkrypty nie są jedynymi, i że białko HAX-1 może wiązać inne cząsteczki RNA. W celu sprawdzenia tej hipotezy i identyfikacji dodatkowych transkryptów doktorantka postanowiła wykorzystać metodę CRAC, opracowaną m. in. przez dra G. Kudłę z grupy prof. Tollerveya z Uniwersytetu w Edynburgu. Metoda ta polega na chromatografii powinowactwa kompleksów badanego białka z RNA, a następnie na sekwencjonowaniu nowej generacji wychwyconych RNA. Kompleksowanie uzyskuje się przez tzw. cross-linking światłem UV o długości 254 nm. Badane białko jest kodowane przez konstrukt stanowiący fuzję regionu heksahistydynowego i regionu fragmentu białka A oddzielonych linkerem wrażliwym na proteazę TEV. W ten sposób po uwolnieniu kompleksów z naświetlonych komórki można dokonać oczyszczania stosując kolejno złoża zawierające IgG a następnie nikiel. Oczyszczone

kompleksy RNA-białko HAX-1 trawi się proteazą, zaś uwolnione RNA poddaje się sekwencjonowaniu nowej generacji.

Na uznanie zasługuje zastosowanie przez doktorantkę dwóch rodzajów fuzji genowych do chromatografii powinowactwa: zarówno na N-końcu białka HAX-1, jak i na jego C-końcu. Jak się bowiem okazało, tylko fuzja N-końcowa była w stanie efektywnie wiązać RNA, oznacza to, że wolny C-końiec białka HAX-1 jest niezbędny do rozpoznawania komórkowych transkryptów.

Analiza sekwencji RNA związanych przez białko HAX-1 przyniosła niezwykle cenne informacje. Po pierwsze, zidentyfikowano i opisano osiem transkryptów najsilniej wiązanych przez białko HAX-1. Po drugie, korelowano uzyskane wyniki z badaniami transkryptomycznymi ukazującymi zmiany poziomów konkretnych RNA po wyciszeniu białka HAX1. Ponadto doktorantka wykonała szereg badań po wyciszeniu genu kodującego HAX-1. Zmiany poziomu mRNA HAX-1 wpływały na poziomy transkrypcji genów związanych z migracją komórek.

Za najważniejszy wynik uzyskany w recenzowanej pracy uważam obserwację, że białko HAX-1 wiąże się preferencyjnie do obszarów intronowych w RNA. Jest to niezwykle ważne dla dalszych prac nad funkcją HAX-1 w metabolizmie RNA. Autorka postawiła trzy hipotezy, które będą musiały być testowane przez następne pokolenia badaczy studiujących białko HAX-1 :

1. białko HAX-1 pełni rolę w procesie tzw. zatrzymywania intronów w mRNA
2. HAX-1 bierze udział w splicingu
3. HAX-1 kieruje transkrypty na drogę degradacji

Tak więc podstawową zaletą ocenianej rozprawy doktorskiej jest uzyskanie nowych, cennych wyników i otworenie na ich podstawie zupełnie nowych perspektyw badawczych.

Eksperymenty przeprowadzane przez autorkę należą do arsenału nowoczesnych metod biologii molekularnej.

Rozprawa doktorska napisana jest w sposób klasyczny, to znaczy ma formę maszynopisu. Z obowiązku recenzenta zmuszony jestem przedstawić kilka uwag krytycznych, które jednak dotyczą wyłącznie sposobu prezentacji. Wstęp zawiera stanowczo za mało informacji na temat białka HAX-1, które jest przecież obiektem badań opisywanych w tej pracy. W bazie danych PubMed można znaleźć 75 publikacji na temat HAX-1, z których doktorantka cytuje jedynie 16, i omawia bardzo pobieżnie poświęcając zaledwie jedną stronę tekstu. Z kolei w dyskusji oczekiwałbym propozycji konkretnych dalszych badań nad udziałem białka HAX w splicingu lub degradacji mRNA.

Powyższe uwagi nie umniejszają mojej wysokiej oceny przedstawionej rozprawy doktorskiej. Badania zostały prawidłowo zaplanowane i dobrze przeprowadzone. Uzyskane wyniki są cennym wkładem do wiedzy na temat działania białka HAX-1 pełniącego istotną i wciąż nie do końca poznaną rolę w procesach nowotworzenia.

Z powyższych powodów uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pani magister Eweliny Macech-Klickiej spełnia wszystkie ustawowe wymagania stawiane pracom doktorskim i dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Centrum Onkologii-Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie o dopuszczenie pani Eweliny Macech-Klickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in red ink, consisting of stylized, flowing letters that appear to be 'P. A. K.' followed by a long horizontal stroke.