

Kraków, 3.09.2016



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

O C E N A

**Pracy doktorskiej mgr Eweliny Macech-Klickiej,
doktorantki w Zakładzie Onkologii Molekularnej i Translacyjnej
Centrum Onkologii – Instytucie im. Marii Skłodowskiej-Curie**

**Tytuł pracy: "Identyfikacja RNA wiązanych przez ludzkie białko HAX1
z użyciem metody CRAC"**

Białko HAX1 zostało opisane jako czynnik oddziałujący z białkiem HS-1, charakterystycznym dla komórek hematopoetycznych, pośredniczącym w transdukcji sygnału od receptora limfocytów B. Następnie okazało się, że białko HAX1 współdziała również z innymi białkami, biorąc udział w regulacji wielu procesów komórkowych, między innymi apoptozy i migracji. Zdawano sobie sprawę, że jest to białko niezbędne do prawidłowego działania organizmu – myszy pozbawione HAX1 przeżywają jedynie kilkanaście tygodni, głównie z powodu zaburzeń funkcji układu nerwowego i odpornościowego. Molekularne mechanizmy aktywności białka HAX1 były jednak przez długi czas słabo poznane.

Kilka lat temu wykazano, że HAX1 może wiązać mRNA, a wiązanie to może mieć istotne znaczenie funkcjonalne. Potwierdzono je dla dwóch transkryptów: najpierw dla wimentyny, gdzie wiązanie HAX1 jest niezbędne do prawidłowej lokalizacji transkryptu w komórce, a następnie dla polimerazy DNA β , gdzie wiązanie HAX1 może mieć wpływ na poziom ekspresji genu. W obu przypadkach miejscem wiązania był odcinek 3'UTR transkryptów. Uderzające było, że transkrypty wiążące się z HAX1 nie wykazywały podobieństw w sekwencji, poza obecnością odcinków o strukturze spinki, wzbogaconych w uracyl. Obserwacja ta mogła sugerować, że wiązanie HAX1 nie ogranicza się do dwóch transkryptów, lecz może mieć znacznie większy zakres.

Zagadnienie to stało się przedmiotem rozprawy doktorskiej Pani mgr Eweliny Macech-Klickiej. Temat ten stanowi bezpośrednią kontynuację wcześniejszych badań pani dr hab. Ewy Grzybowskiej – Promotora pracy doktorskiej a jednocześnie współautora prac opisujących wiązanie HAX1 do transkryptu polimerazy DNA β . Głównym celem Doktorantki było określenie czy HAX1 wiąże się z większą liczbą cząsteczek RNA niż sądzono do tej pory oraz scharakteryzowanie tych oddziaływań.

Wydział Biochemii,

Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii

Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6411

+48 519 347 621

fax +48 12 664 6918

alicja.jozkowicz@uj.edu.pl

<http://biotka.mol.uj.edu.pl/zbm/>

Prace prowadzone były na unieśmiertelnionych ludzkich liniach komórkowych pochodzenia nabłonkowego lub mezenchymalnego, hodowanych w standardowych warunkach *in vitro*. Doktorantka skupiła się na próbie identyfikacji całej puli RNA wiążących się do białka HAX1 oraz określeniu miejsc wiązania w cząsteczkach RNA. Temat był więc nie tylko bardzo ciekawy poznawczo, ale również ambitny, wymagający użycia nowoczesnej metodyki. Dodatkowo Doktorantka postawiła sobie za zadanie wskazanie najważniejszych transkryptów wiążących się z HAX1 i sprawdzenie funkcjonalnego znaczenia takiego oddziaływania.

Analiza wybranych przez Doktorantkę zagadnień wymagała zastosowania technik z zakresu biologii komórki i biologii molekularnej, w tym metod bioinformatycznych. Obejmowały one konstrukcję i namnażanie wektorów plazmidowych do wyciszenia i nadekspresji HAX1 oraz wyprowadzanie zmodyfikowanych genetycznie linii komórkowych, testy funkcjonalne (testy migracji komórek), analizy ekspresji genów na poziomie mRNA (qRT-PCR) i białka (western blotting), analizy całego transkryptomu wykorzystujące mikromacierze, izolacje RNA związanego z badanym białkiem wykorzystujące metodę CRAC, sekwencjonowanie NGS uzyskanego RNA oraz analizy bioinformatyczne wyników otrzymane z mikromacierzy i NGS. Warto podkreślić, że uzyskiwane wyniki były weryfikowane za pomocą komplementarnych technik, co zasługuje na uznanie. Metodyka pracy była więc nowoczesna, różnorodna i dobrana w sposób pozwalający na realizację wyznaczonych zadań.

Badania przeprowadzone zostały przez Doktorantkę z wykorzystaniem kilku linii komórkowych: HEK293-FltInTRex (komórki kontrolne oraz z nadekspresją AGO2 lub indukowaną nadekspresją HAX1), HeLa (kontrolne i z wyciszoną ekspresją HAX1), MDA-MB-231 (kontrolne i z wyciszoną ekspresją HAX1), MCF7 (kontrolne i z wyciszoną ekspresją HAX1), HEK293 (kontrolne i z wyciszoną ekspresją HAX1). Linie zmodyfikowane genetycznie zostały przygotowane przez Doktorantkę w ramach prowadzonych badań lub uzyskane od współpracujących zespołów. Pochodzenie komórek jest jasno wskazane w opisie metodyki.

Najważniejsze wyniki uzyskane przez Doktorantkę to: i) wykazanie, że HAX1 może prawdopodobnie wiązać różnorodne klasy RNA, w tym liczne mRNA oraz lncRNA, ii) wykazanie, że miejsce wiązania transkryptów to przede wszystkim sekwencje zlokalizowane w intronach. Doktorantka opisała również wpływ wyciszenia HAX1 na migrację komórek oraz na poziom ekspresji genów których mRNA może wiązać się do białka HAX1.

Rozprawa doktorska mgr Eweliny Macech-Klickiej liczy 135 stron maszynopisu, w tym 41 rysunków i fotografii oraz 7 tabel (w tym 2 w suplemencie).



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6411

+48 519 347 621

fax +48 12 664 6918

alicia.jozkowicz@uj.edu.pl

<http://biotka.mol.uj.edu.pl/zbm/>

Cytowane piśmiennictwo to 163 pozycje. Praca zbudowana jest w sposób klasyczny i obejmuje: Streszczenie, anglojęzyczny Abstract, Wstęp z wyodrębnionymi w osobny podrozdział Załoženiami i Celami Pracy, Materiały, Metody, Wyniki i Dyskusję. Całość poprzedzona jest Spisem Treści i Wykazem Skrótów, a zakończona Wnioskami oraz Suplementem i Bibliografią. Zarówno kompozycja pracy jak i zawartość poszczególnych części jest prawidłowa, a spis treści jest dobrze przygotowany i ułatwia lekturę pracy. Spis skrótów jest bardzo rozbudowany i starannie przygotowany. Pewna niekonsekwencja, czyli rezygnacja w niektórych przypadkach z przytaczania/tworzenia nazw polskich i pozostanie przy nazwach angielskich, jest akceptowalna. Mam jedynie wątpliwość co do rozwinięcia skrótu tRNA – lepiej mówić o RNA transportującym a nie transportowym.

Streszczenie jest napisane poprawnie – dobrze wprowadza w temat, wskazuje stosowane metody i podsumowuje ogólne wnioski płynące z pracy. Brakuje w nim natomiast informacji na jakich komórkach wykonywane były badania oraz jaką odpowiedź uzyskano na najważniejsze pytanie – czy HAX1 może wiązać większą liczbę transkryptów i ewentualnie jakich. To pośrednio wynika z treści Streszczenia, ale powinno być napisane *expressis verbis*.

Liczący 32 strony Wstęp jest prawidłowo skomponowany, napisany ciekawie i dobrze wprowadza w tematykę badań. Wstęp rozpoczyna się od omówienia etapów potranskrypcyjnej regulacji genów u *Eukaryota*, w tym modyfikacji końców RNA, składania transkryptów, transportu RNA do cytoplazmy, stabilizacji mRNA i roli sekwencji 3'UTR oraz inicjacji translacji. Następnie Doktorantka charakteryzuje cechy białek wiążących RNA i ich rolę w regulacji ekspresji genów i przechodzi do dokładnego omówienia obecnego stanu wiedzy na temat białka HAX1 i wiązania przez nie transkryptów. Ta część Wstępu napisana jest dobrym stylem i poprawnym językiem, ma logiczny układ i jest ilustrowana przydatnymi schematami. Doktorantce udaje się unikać wrażenia przygotowania leksykonu, zamiast tego w sposób jasny i ciekawy opisuje kolejne procesy. Ostatnia część Wstępu omawia metody stosowane w badaniach oddziaływań białko-RNA, w tym drożdżowy system trójhybrydowy, immunoprecypitację RNA, technikę CLIP, a zwłaszcza metodę CRAC, będącą najważniejszym narzędziem wykorzystanym w pracy. Ta część Wstępu miejscami sprawia wrażenie zbyt skrótowego i leksykalnego streszczenia protokołów, bez logicznych przejść między poszczególnymi opisami. Dobrym pomysłem są natomiast krótkie podsumowania zalet i ograniczeń poszczególnych metod oraz czytelne schematy, zwykle bardziej informatywne od samego opisu. Szkoda, że nie ma krótkiego podsumowania metod, ze wskazaniem która z nich i dlaczego wydaje się najlepsza. Cały Wstęp tworzy jednak dobrą i logiczną całość i uzasadnia celowość



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,

Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii

Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6411

+48 519 347 621

fax +48 12 664 6918

alicja.jozkowicz@uj.edu.pl

<http://biotka.mol.uj.edu.pl/zbm/>

podjętych prac, a dobór treści i sposób omawiania zagadnień potwierdzają dobrą orientację Doktorantki w tematyce badań.

Główny cel pracy określony jest jasno i jednoznacznie. Również cele szczegółowe opisane są precyzyjnie. Dobrym pomysłem jest poprzedzenie opisu celów krótkim podsumowaniem argumentów przemawiających za podjęciem badań. Widać dzięki temu, że postawione pytania badawcze są logiczną konsekwencją wcześniejszych prac.

Doktorantka na 31 stronach opisuje metody stosowane w pracy. Opisy te są bardzo wyczerpujące i szczegółowe (łącznie z informacją, że mleko odtłuszczone pochodziło ze Spółdzielni Mleczarskiej w Gostyniu), w pełni wystarczające do powtórzenia przeprowadzonych doświadczeń. Przedstawione są również mapy wszystkich używanych konstruktów i skład wszystkich buforów. Opisy są w zasadzie protokołami laboratoryjnymi i moim zdaniem część z nich można by skrócić. Mam jedynie uwagę do opisu warunków wirowania – lepiej podawać wartości *g* niż rpm. Warto byłoby też dodać informację o analizie statystycznej wyników doświadczeń nie związanych z NGS i mikromacierzami, takich jak analiza migracji czy ekspresji genów określonej metodą qRT-PCR.

Wyniki (zajmujące 32 strony) są jasno przedstawione i zilustrowane wykresami oraz zdjęciami. Ich interpretacja przez Doktorantkę jest wiarygodna i ostrożna, wskazująca na dobre zrozumienie zarówno znakomitych możliwości jak i ograniczeń stosowanych metod. Legendy rycin są wystarczająco dokładne. Układ wyników jest uporządkowany bardziej pod kątem stosowanych metod/typu wykonywanych analiz niż kolejnych etapów poszukiwania odpowiedzi na postawione pytania. Może to sprawiać wrażenie przesunięcia równowagi między drogą do osiągnięcia celu (metodyka) a samym celem (odpowiedź na pytanie). Prowadzenie opisu zgodnie rozwiązywaniem problemu badawczego byłoby dla mnie ciekawsze i bardziej uzasadnione, to jednak ocena subiektywna, a nie wartościująca. Opis prowadzony jest konsekwentnie, może być więc uznany za prawidłowy.

Pierwsza część opisu dotyczy przygotowania konstruktów plazmidowych i wyprowadzania linii komórkowych ze zmienioną ekspresją HAX1, w tym linii przygotowanych do użycia w metodzie CRAC. Kolejna część to opis wykorzystania CRAC do identyfikacji puli RNA wiążących się do białka HAX1. Identyfikację przeprowadzono z wykorzystaniem NGS na platformie Illumina Mi-Seq. W moim przekonaniu ta część wyników stanowi najciekawszą i najbardziej wartościową poznawczo część pracy i będzie prawdopodobnie podstawą zarówno publikacji jak i dalszych, bardziej szczegółowych badań. W kolejnym etapie Doktorantka uzasadnia wybór ośmiu transkryptów zidentyfikowanych jako RNA wiążące się do białka HAX1.



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6411

+48 519 347 621

fax +48 12 664 6918

alicja.jozkowicz@uj.edu.pl

<http://biotka.mol.uj.edu.pl/zbm/>

Ich dobór jest racjonalny – wybrane transkrypty reprezentują różne miejsca lokalizacji sekwencji wiążącej się z białkiem. Przeprowadzone badania miały na celu sprawdzenie czy wyciszenie ekspresji HAX1 wpływa na poziom ekspresji wybranych ośmiu transkryptów. Doświadczenia wykonano na linii HeLa, MDA-MB-231 i MCF-7. Wyniki wskazują, że potencjalna regulacja nie ma charakteru uniwersalnego lecz jest raczej charakterystyczna dla danej linii komórkowej. Interpretacja doświadczeń musi być ostrożna ze względu na odmienność wyników uzyskiwanych w przypadku niektórych genów w poszczególnych klonach tej samej linii. Na uznanie zasługuje wykonanie przez Doktorantkę doświadczeń na różnych klonach, co pozwala od razu zweryfikować istotność biologiczną niektórych obserwowanych korelacji. Kolejna część opisu wyników dotyczy analizy mikromacierzowej, mającej wykazać wpływ wyciszenia HAX1 na transkryptom badanych komórek linii HeLa, MDA-MB-231 i MCF-7. Moim zdaniem interpretacja analiz mikromacierzowych przeprowadzonych na liniach komórkowych (linia kontrolna *versus* linia z wyciszoną ekspresją badanego genu) musi być bardzo ostrożna, zwłaszcza biorąc pod uwagę opisane wcześniej różnice w ekspresji analizowanych genów między poszczególnymi klonami linii. Zastanawiam się też, czy nie lepszym rozwiązaniem byłoby wykonanie analizy transkryptomowej NSG RNA-seq, analogicznie jak przy identyfikacji RNA związanego z HAX1. To mogłoby ułatwić porównywanie wyników i zwiększyć możliwości formułowania wiarygodnych wniosków. Ostatnia część Wyników to opis doświadczeń analizujących wpływ wyciszenia HAX1 na migrację komórek trzech badanych linii w teście zarastania rysy *in vitro*.

Opis wyników nasuwa mi kilka pytań i sugestii:

- Str. 77, Ryc. 19: Legenda pod ryciną mówi o wyciszonej i niezmienionej ekspresji genu. Linia kontrolna to linia z wprowadzonym konstruktem kontrolnym. Taki układ jest prawidłowy. Jednak aby mówić o ekspresji niezmienionej w linii kontrolnej lepiej byłoby pokazać dodatkowo linię intact, bez modyfikacji. Lepiej byłoby też nie przycinać tak mocno zdjęć pokazujących prążki na blocie z linii HEK293, nawet jeśli dzięki temu unika się pokazania ewentualnych prążków niespecyficznych.
- Str. 79, Ryc. 21 Na elektroforegramie pokazany jest marker masowy (λ RcoRI+HindIII). Wydaje mi się, że podpis długości prążków nie jest prawidłowy – to nie wpływa na informację wynikającą z elektroforezy, ale prążek podpisany jako 4973 bp powinien mieć chyba długość 3530 bp.
- Str. 87: opis kończy się informacją, że wyniki "poddano kolejnym analizom w celu zawężenia listy związanych RNA do tych najbardziej prawdopodobnych". Byłoby ciekawe napisanie kilku zdań na temat rodzaju analiz, a przede wszystkim ich

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7
PL 30-387 Kraków
tel. +48 12 664 6411
+48 519 347 621

fax +48 12 664 6918
alicja.jozkowicz@uj.edu.pl
<http://biotka.mol.uj.edu.pl/zbm/>

wyników – jakie RNA wytypowano. Taka informacja wynika pośrednio z dalszych opisów, ale lepiej byłoby ją umieścić w tym miejscu.

- Badania poziomu ekspresji mRNA wybranych genów (Ryc. 34): wartościowe byłoby sprawdzenie poziomu nie tylko mRNA, ale również białka. Może się bowiem okazać, że interakcja z HAX1 nie wpływa na poziom transkryptu, ale może wpływać na efektywność translacji. W opisie tych wyników brakuje mi informacji o analizie statystycznej, istotności różnic nie są również zaznaczone na wykresach. Opis doświadczeń: "We wszystkich trzech badanych liniach uzyskano zmiany ekspresji wybranych transkryptów w każdym z dwóch klonów z wyciszoną ekspresją genu HAX1 w porównaniu dl klonu z niezmienionym poziomem ekspresji genu HAX1" jest zbyt lakoniczny. Warto byłoby też odnieść się do obserwowanych różnic między liniami i między klonami. Może warto byłoby sprawdzić (analizując więcej klonów dla wybranego genu) na ile poziom wyciszenia HAX1 w różnych klonach może przyczynić się do obserwowanych różnic?

- Str. 101: stwierdzenie, że gen ARPC2 ma wyraźnie obniżoną ekspresję we wszystkich trzech liniach wydaje mi się dyskusyjne w przypadku linii MCF-7. Mam też wątpliwość czy można mówić o analizie w 6 powtórzeniach jeśli są to trzy powtórzenia dla linii kontrolnej i trzy powtórzenia dla linii z wyciszoną ekspresją HAX1. Dla mnie to doświadczenie wykonane w trzech powtórzeniach.

- Ryc. 37: brakuje informacji o analizie statystycznej i zaznaczenia istotności różnic na wykresach.

- Ryc. 38: przy badaniach migracji metodą zarastania rysy istnieje ryzyko wpływu na tempo zarastania rysy przez proliferację, a nie tylko migrację komórek. W jaki sposób wykluczona została (lub sprawdzona) proliferacja badanych komórek?

Dyskusja obejmuje 13 stron i skupia się przede wszystkim na podsumowaniu uzyskanych wyników oraz ich omówieniu w świetle możliwych regulacji ekspresji genów, wpływu na dojrzewanie RNA i możliwe znaczenie funkcjonalne. Wnioskowanie to jest nieco spekulatywne ze względu na typ uzyskanych w pracy danych, ale uzasadnione. Sugerowane znaczenie biologiczne opisanych interakcji, choć będzie wymagać dalszych badań, jest bardzo ciekawe. Co istotne, wnioski wysuwane są ostrożnie – w każdym razie Doktorantka pisze o sugestiach i wskazówkach, a nie o dowodach wynikających z przeprowadzonych badań. Nie wysuwa też wniosków o rzeczywistej zależności procesów na podstawie stwierdzenia korelacji. Trochę brakuje mi natomiast w Dyskusji próby wyjaśnienia różnic między liniami, albo przedyskutowania podobnych rozbieżności stwierdzanych w innych badaniach – zwłaszcza próby rozważenia na ile tego typu analizy odzwierciedlają rzeczywiste różnice biologiczne w komórkach pierwotnych. Warto byłoby też nieco



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6411

+48 519 347 621

fax +48 12 664 6918

alicja.jozkowicz@uj.edu.pl

<http://biotka.mol.uj.edu.pl/zbm/>

głębiej przedyskutować uzyskane wyniki w kontekście pierwszej pracy opisującej interakcje HAX1 i RNA wimentyny, w której zwracano uwagę na specyficzność wiązania. Duża i ciekawa część dyskusji poświęcona jest metodyce badania interakcji RNA-białko oraz ocenom profilu ekspresji genów. Doktorantka wskazuje na ograniczenia stosowanych w badaniach metod. Takie podejście świadczy o rzetelności badawczej i zasługuje na uznanie.

Wnioski wyodrębnione w osobny podrozdział stanowią listę najważniejszych obserwacji poczynionych w trakcie realizacji pracy. Są one jasno sformułowane i mają potwierdzenie w wynikach doświadczeń.

Praca pod względem edytorskim przygotowana jest poprawnie, zawiera trochę błędów literowych, ale są one nie do uniknięcia. Może warto na przyszłość pamiętać, że nazwa fundacji The Wellcome Trust pochodzi od nazwiska, stąd pisownia przez dwa "L". Ten błąd pojawia się wielokrotnie w pracy. Niezręczności stylistyczne i błędy gramatyczne są niewielkie (np. stosowanie rodzaju nijakiego do RNA). Drobne niedociągnięcia edytorskie nie wpływają na jakość merytoryczną pracy.

Podsumowując, badania opisane przez Doktorantkę dotyczą bardzo ciekawego tematu, a wykonane zostały z wykorzystaniem nowoczesnych i dobrze dobranych metod. Pozwoliły na uzyskanie wartościowych i ważnych poznawczo danych, które mogą być również punktem wyjścia dla wielu kolejnych prac. Uważam, że pani mgr Ewelina Macech-Klicka zrealizowała założone cele badawcze i stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wszystkie wymogi rozprawy doktorskiej. W związku z tym proszę wysoką Radę Centrum Onkologii-Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie o dopuszczenie pani mgr Eweliny Macech-Klickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem,



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii
Medycznej

prof. dr hab. Alicja Józkowicz

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6411

+48 519 347 621

fax +48 12 664 6918

alicia.jozkowicz@uj.edu.pl

<http://biotka.mol.uj.edu.pl/zbm/>