



Prof. dr hab.
Jadwiga Jaruzelska
ul. Strzeszyńska 32
60-479 Poznań

tel. +48/61/657 91 00
fax +48/61/823 32 35
e-mail: jadwiga.jaruzelska@igcz.poznan.pl
www.igcz.poznan.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej

pt. **”Kompozycja i dynamika chromatyny w obszarach terminacji transkrypcji u człowieka”**

Doktorantka: **Pani mgr Magda Kopczyńska**

Rozprawa dotyczy regulacji ekspresji genów kodujących białka na etapie terminacji transkrypcji, interesującej, bo znacznie słabiej poznanej niż inicjacja i elongacja, i stanowiącej duże wyzwanie metodologiczne. Została przygotowana pod kierunkiem prof. UAM dr. hab. Pani Kingi Kamieniarz-Gduli, której dorobek dotyczący powyższego problemu jest znakomity. Rozprawa ma formę hybrydową. Jest bioinformatyczna. Wyniki zostały zawarte w opublikowanym w *Nucleic Acid Research* artykule oryginalnym oraz w nieopublikowanym manuskrypcie oryginalnym, oba z jej pierwszym autorstwem. Ponadto Pani Kopczyńska jest drugim autorem artykułu opublikowanego jako *preview* w *Neuron Cell Press*. Wreszcie część wyników opisanych w rozprawie nie ma jeszcze formy manuskryptu. Rozprawa zawiera wstęp, cel, opis wyników, dyskusję oraz kopie publikacji *NAR* oraz *Neuron*. W opisie wyników Autorka oświadczyła, jaką ich część uzyskała osobiście, oraz zawarła stosowne oświadczenia pozostałych autorów o ich udziale.

ARTYKUŁ 1 Skoro centrum badań stanowi kwestia regulacji transkrypcji na poziomie terminacji, Pani Kopczyńska skupiła się na ambitnym zadaniu: wypracowaniu narzędzia bioinformatycznego pozwalającego terminację zlokalizować. Punktem wyjścia były badania innych autorów wykonane w drożdżach, według których treonina w pozycji 4 C-końcowej domeny RNAPII (T4ph) w genach kodujących białka występuje w miejscach stopowania polimerazy. Inni autorzy pokazali negatywny wpływ mutacji tejże treoniny na żywotność komórek ludzkich w hodowli. W swoich badaniach nad znaczeniem T4ph skorzystała ze zbiorów danych pochodzących z różnych grup zwierząt, danych uzyskanych z zastosowaniem techniki NET-seq. Technika ta umożliwia oznaczenie pozycji RNAPII i jej stopowania z dokładnością jednego nukleotydu w obrębie genu oraz zapewnia specyficzność w

stosunku do nici. Za pomocą zaprojektowanych przez nią analiz bioinformatycznych powyższych zbiorów danych pokazała istotne ogólnogenomowe wzbogacenie T4ph w miejscach stopowania RNAPII, w którychkolwiek miejscach genu występuje. Analizy te wskazały na obecność T4ph począwszy od miejsca startu transkrypcji (TSS), w którym powszechnie dochodzi do stopowania transkrypcji RNAPII około 20–40 nukleotydów w dół od TSS. Koncentracja T4ph była coraz większa ku końcowej terminacji i skumulowana około 2 kb poniżej miejsca poliadenylacji (PAS). Miejsca koncentracji T4ph nazwała „oknami terminacyjnymi” transkrypcji. Zatem ważnym osiągnięciem w tej części rozprawy było pokazanie T4ph jako markera stopowania RNAPII, co było bardzo istotne dla dalszej części badań. Owe okna terminacji okazały się charakterystyczne dla genów kodujących białka, natomiast nie są obecne w genach niekodujących. W tych ostatnich T4ph jest mniej obecna i rozłożona na całej długości genu. Analiza bioinformatyczna zbiorów danych powyższych, opartych na powyższych precyzyjnych technikach transkryptomicznych, pozwoliła również uchwycić miejsca przedwczesnej terminacji poniżej TSS w pojedynczych genach.

BADANIA NIEOPUBLIKOWANE Bardzo istotny aspekt dalszych części badań stanowiła próba odróżnienia terminacji końcowej od przedwczesnej. W nieopublikowanej części badań Pani Kopczyńska opisała analizę przeprowadzoną pod tym kątem na zbiorach danych T4ph mNET-seq genów kodujących białka komórek HeLa. Zaprojektowane przez nią analizy bioinformatyczne pozwoliły ten cel osiągnąć. W dalszej części, w poszukiwaniu molekularnego podłoża tych dwóch typów terminacji, skorzystała z 17 zbiorów danych ENCODE CHIP-seq pokrywających różne znaczniki epigenetyczne w histonach oraz inne związane z chromatyną. Stwierdziła, że zarówno końcowe, jak i przedwczesne miejsca terminacji transkrypcji są istotnie wzbogacone w czynniki zaangażowane w tworzenie pętli chromatynowych, najczęściej CTCF, SMC3 oraz MAZ. Ponadto wzbogacenie w SMC3 oraz MAZ było większe w przypadku okien terminacyjnych związanych z przedwczesną terminacją niż z końcową, jednak podkreśla, że badania te wymagają potwierdzenia. Ta nieopublikowana część badań jest szczególnie interesująca i oby znalazła ciąg dalszy w przyszłości.

ARTYKUŁ 2 Drugi artykuł skoncentrowany jest na metylotransferazie SETD2 w kontekście regulacji terminacji transkrypcji. Inspiracją do tej części badań była wcześniejsza obserwacja uzyskana w komórkach raka nerki, wskazująca na związek pomiędzy utratą aktywności SETD2 a opóźnioną terminacją transkrypcji przez RNAPII. Zgłębienie mechanizmu u podłoża tej obserwacji wpisywało się znakomicie w główny cel rozprawy – regulację transkrypcji na poziomie terminacji. Metylotransferaza SETD2 jest godna uwagi także dlatego, że jako jedyna metylotransferaza histonowa odpowiada za potrójną metylację lizyny 36 histonu H3 u ssaków. Wśród dynamicznych chromatynowych epigenetycznych znaczników ten typ metylacji histonu 3 jest szczególny, ponieważ pokrywa transkrybowany gen na całej długości, ulegając stopniowemu wzmocnieniu w kierunku 3', osiągając najwyższy poziom w miejscu poliadenylacji (PAS). Pojawia się ko-transkrypcyjnie przez oddziaływanie

SETD2 m.in., z domeną CTD aktywnej RNPII. Badania nad dynamiką tego zjawiska w niniejszej rozprawie stały się możliwe dzięki dostępnym zbiorom danych transkryptomycznych uzyskanych przy zastosowaniu nowoczesnej techniki sekwencjonowania RNA zwanej POINT-seq. Technika ta umożliwia precyzyjne, z dokładnością do jednego nukleotydu, mapowanie miejsc startu transkrypcji oraz ko-transkrypcyjnej obróbki RNA. Dane poddane analizie przez Panią Kopczyńską pochodziły z komórek U2OS wywodzących się z osteosarcoma, w których przeprowadzono knockout genu *SETD2*. Zaskoczeniem w stosunku do oczekiwań była obserwacja, że większość, bo aż około 76% genów (klasa I), nie wykazała opóźnionej terminacji transkrypcji, a jedynie osłabioną o 1/3 inicjację. Natomiast oczekiwana opóźniona terminacja transkrypcji, której dodatkowo towarzyszyło nieprawidłowe cięcie transkryptu, występowała zaledwie u 24% badanych genów (klasa II). W tej grupie inicjacja transkrypcji była prawidłowa, lecz towarzyszyła jej inicjacja kryptyczna, szczególnie blisko końca genu. Skoro zarówno w kontekście knockoutu *SETD2*, jak i w kontekście mutacji katalitycznej zjawisko to występowało, zapewne wskazuje to na bezpośredni wpływ T4ph. Ponadto przeprowadzona analiza pokazała brak powiązania opóźnionej terminacji w genach klasy II z mechanizmem alternatywnej poliadenylacji (APA).

Dalej, by potwierdzić zjawisko opóźnionej terminacji genów klasy II stanowiących główny punkt zainteresowania, Pani Kopczyńska dokonała pomiaru terminalnego stopowania RNPII, stosując jako miarę tego zjawiska wypracowaną w poprzednim artykule rozprawy z *NAR* analizę okien terminacyjnych T4ph-mNETseq. Osiągnięciem w tej części rozprawy było stwierdzenie zbieżności uzyskanych wyników. Bowiem okna terminacyjne zdefiniowane koncentracją T4ph pokrywały się z miejscami zaniku potrójnej metylacji histonu 3 w lizynie 36 (H3K36me3). Stanowiło to potwierdzenie zjawiska opóźnionej terminacji przy zastosowaniu technologii POINT-seq. Dalsze badania nad klasą I i II genów, zgłębienie ich odmiennej odpowiedzi na dysfunkcję *SETD2* w kontekście transkrypcji stanowią interesującą perspektywę. Skoro metylotransferaza *SETD2* jest zaangażowana w alternatywny splicing, czy nie jest to kryterium dalszych badań, dla rozstrzygnięcia przyczyny odmiennej reakcji obu klas genów na dysfunkcję *SETD2*?

ARTYKUŁ 3. Artykuł *preview* opublikowany w *Neuron Cell Press* jest teoretyczną polemiczną dyskusją nad znaczeniem przedwczesnej terminacji w regulacji transkrypcji i fizjologii komórki w kontekście chorób neurodegeneracyjnych. Przedmiotem dyskusji jest neurodegeneracyjna choroba PCH10 spowodowana homozygotyczną mutacją zmiany sensu R140H w białku CLP1, składniku maszynierii odpowiedzialnej za obróbkę końca 3' pre-mRNA w neuronach motorycznych. Na poziomie molekularnym prawidłowe neurony motoryczne posiadają wysoką różnorodność użycia różnych miejsc poliadenylacji wewnątrz genu, w tym w intronach i regionach kodujących, wskazującą na znaczny zakres przedwczesnej terminacji transkrypcji. Natomiast w przypadku choroby PCH10 zróżnicowanie izoform pod względem 3'UTR jest znacznie mniejsze, z akcentem na wyższą częstość izoform dłuższych. W rozważaniach tej kwestii nasuwa się pytanie, jak rozróżnić przedwczesną terminację

transkrypcji od użycia przez komórkę wcześniejszych proksymalnych sygnałów poliadenylacji? Ponadto *knockout* genu *CLPI* w neuronach motorycznych spowodował przesunięcie użycia APA w kierunku terminacji proksymalnej, a więc sytuację przeciwną do PCH10. Nasuwa się ogólna refleksja, jak bardzo różny efekt może wywołać specyficzna mutacja genu w funkcji kodowanej przez nie białka od całkowitego usunięcia genu. Być może w przypadku mutacji R140H mamy do czynienia ze zjawiskiem *gain of function*?

Podsumowanie

Rozprawa jest kilkuwarstwowa i bardzo interesująca. Pod jej tytułem kryje się analiza kilku bardzo ciekawych zjawisk epigenetycznych chromatyny towarzyszących transkrypcji, pełniących rolę regulatorową, aby lepiej poznać regulację terminacji. W swoich badaniach Pani Kopczyńska korzystała ze zbiorów danych, które były uzyskane w oparciu o najnowocześniejsze techniki transkryptomiczne mNET-seq oraz POINT-seq. Bardzo dokładnie opisała ciągi analiz bioinformatycznych, które zaprojektowała i z powodzeniem zastosowała. Ważnym osiągnięciem było wypracowanie markera stopowania RNPII w postaci miejsc koncentracji T4ph. Ponadto pokazanie roli SETD2 w zapewnianiu wierności transkrypcji oraz wskazanie po raz pierwszy na rolę SETD2 w promowaniu wydajności cięcia 3'-transkryptu oraz zapobieganiu kryptycznej inicjacji transkrypcji mają dużą wartość. Bardzo doceniłam krytycyzm Pani Kopczyńskiej w interpretacji wyników i zwrócenie uwagi na konieczność wypracowania bardziej precyzyjnych metod analizy w przyszłości. Ważnym aspektem rozprawy jest znaczenie tych badań dla medycyny, np. w ocenie mutacji w regionach niekodujących i ich powiązania z chorobami człowieka.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Magdy Kopczyńskiej jest bardzo wartościowa i bez wątpienia spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.), Ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.). Dlatego wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu Adama Mickiewicza o dopuszczenie Pani mgr Magdy Kopczyńskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

