

**Prof. dr hab. Barbara Nawrot**

Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych  
Polskiej Akademii Nauk  
Dział Chemii Bioorganicznej  
Ul. H. Sienkiewicza 112  
90-363 Łódź  
Tel. +48-604 783945, +48 42 6308 248  
Email: [barbara.nawrot@cbmm.lodz.pl](mailto:barbara.nawrot@cbmm.lodz.pl)  
[www.cbmm.lodz.pl](http://www.cbmm.lodz.pl)

5 kwietnia 2024 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Michała Tyrasa  
pt.: „Badania funkcjonalne enzymów dekapujących, poszukiwania ich  
partnerów komórkowych i eksploracja wzajemnych zależności w tworzonych  
kompleksach białkowych”**

Niniejszą recenzję sporządziłam w związku z powołaniem mnie przez Radę Naukową Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warszawskiego w dniu 19 czerwca 2023 roku na recenzenta w postępowaniu doktorskim mgr inż. Michała Tyrasa. Zgodnie z Ustawą z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668), w przedstawionej rozprawie doktorskiej oceniłam oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz ogólną teoretyczną wiedzę Doktoranta w dyscyplinie nauk biologicznych, a także umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej pod opieką promotora.

***Ocena formalna***

Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk o życiu, w dyscyplinie nauk biologicznych została wykonana na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego pod kierunkiem dwóch promotorów, Pana Profesora dr. hab. Edwarda Darżynkiewicza, którego odejście z naszego grona biologów, chemików, biologów molekularnych jest ogromną i niepowetowaną stratą, oraz Pana Profesora dr. hab. Michała Dadleza. Rozprawa doktorska jest objętościowo dosyć obszerna; opisana na łącznie 169 stronach tekstu, zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim, słowa kluczowe, spis dorobku naukowego Doktoranta zawierający współautorstwo trzech manuskryptów w przygotowaniu (mgr M. Tyras jako pierwszy autor), trzech prac opublikowanych w trakcie realizacji pracy doktorskiej oraz czterech komunikatów w formie plakatów. Kolejno rozprawa zawiera dobrze przygotowany, szczegółowy spis treści, spis 69 rysunków i 4 tabel, wykaz stosowanych skrótów, przedmowę, 36-stronicowy wstęp

literaturowy, 40-stronicowy opis wyników, a następnie rozdział materiały i metody (20 stron), 12-stronicową dyskusję i krótkie podsumowanie. Dodatkowo w rozprawie zamieszczono 7-stronicowy materiał nazwany tutaj suplementem oraz bibliografię liczącą aż 418 pozycji. Jedna z trzech opublikowanych prac ze współautorstwem Doktoranta znalazła się jako odnośnik we wspomnianym spisie literaturowym. Szkoda, że wyniki wchodzące w skład rozprawy doktorskiej nie zostały do tej pory opublikowane, ale rozumiem, że okoliczności sfinalizowania tego procesu nie były sprzyjające. Wyrażam przy tym nadzieję, że Doktorantowi uda się wkrótce opublikować te trzy przygotowywane manuskrypty.

**Podsumowując, zarówno struktura rozprawy jak i zawartość merytoryczna poszczególnych jej części nie budzą zastrzeżeń. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymagania rozprawy monograficznej stanowiącej dzieło naukowe. Zawiera wszystkie niezbędne elementy dzieła, takie jak podstawowe informacje naukowe, dane eksperymentalne i omówienie oryginalnych wyników własnych, także w kontekście wiedzy dostępnej w literaturze przedmiotu.**

### ***Ocena merytoryczna***

Rozprawa doktorska została wykonana w zespole Profesora Edwarda Darzynkiewicza, który był jednym z pierwszych inicjatorów badań w zakresie syntezy chemicznej analogów specyficznego fragmentu cząsteczek mRNA, tzw. kapu (inaczej: czapeczki, ang. *cap*) i badania procesów biologicznych związanych z obecnością kapu w strukturze mRNA. Tematyka ta okazała się niezwykle nośna, nie tylko w pod względem rozwinięcia syntezy różnorodnych analogów kapu, ale przede wszystkim w uzyskaniu narzędzi do badań strukturalnych i funkcjonalnych, w szczególności procesów molekularnych regulujących ekspresję genów na poziomie mRNA. Tematyka ta, początkowo rozwijana w warunkach komórkowej homeostazy, nabrała szczególnej wagi gdy pojawiły się możliwości zastosowania mRNA do celów terapeutycznych, w tym do leczenia m.in. chorób o podłożu genetycznym w oparciu o terapię genową czy jako szczepionki przeciwvirusowe i przeciwnowotworowe. W tym otoczeniu naukowym, w Zespole o wysokich kompetencjach i ekspertyzie w zakresie chemii i biologii cząsteczki kapu (ang. *cap*) w strukturze mRNA, Pan mgr Michał Tyras podjął swoje badania w ramach rozprawy doktorskiej. Celem tych badań było poszerzenie wiedzy w zakresie funkcji, architektury i aktywności ludzkiego kompleksu białkowego biorącego udział w usuwaniu kapu z cząsteczki mRNA.

**We Wstępie literaturowym** Doktorant skupił się na omówieniu cyklu życia cząsteczek mRNA, w tym na ko-transkrypcyjnych etapach dojrzewania mRNA i białkach odpowiedzialnych za kolejne etapy procesowania, a także na omówieniu transportu mRNA z jądra do cytoplazmy i zagadnieniach związanych z aktywacją i represją procesu translacji. Szczegółowo omówił etapy biosyntezy struktury kapu i modyfikacji 5'-końca mRNA. Ciekawym tematem poruszonym we Wstępie jest kondensacja kompleksów rybonukleinoproteinowych (mRNP) i wpływ tego zjawiska na regulację procesów komórkowych, m.in. regulację translacji i degradacji mRNA. Doktorant podkreślił, że kompleksy białek związanych z mRNA, tworzące się poprzez oddziaływania elektrostatyczne, warstwowe czy hydrofobowe, wykazują zdolność do separacji od otoczenia komórkowego poprzez kondensację w multimeryczne struktury określane mianem niebłoniastych organelli. Opisuje dwa typy takich granul, a mianowicie granule stresowe i ciała P, które różnią się między sobą kompozycją składników białkowych z racji ich różnej funkcji w metabolizmie mRNA, w tym w kontroli translacji i degradacji mRNA. Doktorant zwrócił uwagę, że pierwotna koncepcja odnosząca się do degradacyjnej funkcji

ciałek P została ostatnio zmodyfikowana i obecnie uważa się, że kompleks mRNP jest przetrzymywany i częściowo degradowany w granulach, ale mRNA może powrócić do puli translacyjnej. Kolejne zagadnienia, którym Doktorant poświęcił nieco uwagi i wykazał się znajomością tematu, to te związane z głównymi szlakami degradacji mRNA, zachodzącymi od 3' lub od 5'-końca mRNA, w tym szczególnie te rozpoczynające się od usunięcia *czapeczki* z 5'-końca mRNA. Degradacja mRNA prowadzona jest przez wieloskładnikowy kompleks dekapujący, w którym jednostką katalityczną jest białko Dcp2 z grupy hydrolaz NUDIX, posiadające zdolność do hydrolizy wiązania fosforanowego w difosforanach nukleozydu i innej cząsteczki, w tym mRNA. Szczegółowo omówione zostały struktury białka Dcp2 w różnych organizmach, włączając w to białko ludzkie. Przedstawiona została organizacja domen w poszczególnych wariantach Dcp2 i funkcje tych domen w trimeryzacji Dcp2 (DT), wiązaniu z innymi białkami (HLM) czy jako domena z funkcją regulatorową (EVH). W kolejnych rozważaniach Doktorant omówił strukturę i funkcję głównych partnerów białka Dcp2, w tym białka Dcp1, EDC3 i EDC4, a także scharakteryzował inne białka tego kompleksu, pełniące funkcję aktywatorów procesów dekapowania i degradacji RNA oraz partnerów w innych szlakach metabolizmu mRNA. Treść tego rozdziału dobrze przygotowuje czytelnika do lektury ocenianej rozprawy doktorskiej.

**Bardzo ambitny cel rozprawy**, polegający na poszerzeniu wiedzy w zakresie struktury i funkcji ludzkiego kompleksu dekapującego został sformułowany w postaci dwóch celów cząstkowych, a mianowicie (i) scharakteryzowanie interaktomu enzymu DCP2 w warunkach homeostazy oraz w warunkach zaburzonej równowagi komórkowej oraz (ii) rekonstrukcja kompleksu dekapującego i zbadanie jego aktywności w warunkach *in vitro*. Dla osiągnięcia obydwu celów cząstkowych zostały zaplanowane szczegółowe zadania badawcze (trzy dla celu pierwszego i cztery dla celu drugiego).

Rozdział **Wyniki** przedstawia szczegółowe wyniki poszczególnych zadań cząstkowych, a rozdział **Dyskusja** interpretację tych wyników, także w kontekście literatury światowej. W pierwszym etapie, którego celem była identyfikacja interaktomu Dcp2, Doktorant zastosował nowoczesną technikę biotynylacji zbliżeniowej, zaliczanej do następnej generacji analizy proteomicznej sprzężonej ze spektrometrią mas. W technice tej za pomocą tytułowego białka Dcp2 w fuzji z bakteryjną ligazą biotyny BirA\* eksprymowanego stabilnie w komórkach HEK293, po dodaniu biotyny Doktorant wywołał biotynylację białek bezpośrednio zasocjowanych z docelowym białkiem, a także tych tworzących krótkotrwałe, słabe kompleksy z Dcp2. Frakcję biotynylowanych białek wydzieloną na złożu streptawidynowym poddał analizie stosując standardowe procedury proteomiczne oparte na porównawczej spektrometrii mas. W metodzie tej, jako system porównawczy, Doktorant wykorzystał komórki stabilnie eksprymujące białko BirA\*, a za białka różnicujące uznawał te, dla których krotność zmiany intensywności sygnału była co najmniej dwukrotnie wyższa. W wyniku tej analizy Doktorant zidentyfikował 23 białka specyficznie wiążące Dcp2 w warunkach homeostazy komórkowej, 94 w warunkach inhibicji elongacji translacji, 57 w warunkach destabilizacji mikrotubul, oraz 233 w warunkach bloku mitotycznego i aż 609 białek wiążących Dcp2 w warunkach stresu oksydacyjnego. Słuszną wydaje się teza, że duża ilość partnerów białkowych zidentyfikowanych w stresie oksydacyjnym wynikała prawdopodobnie z ich losowego znakowania, a co więcej, do analizy porównawczej użyto proteom komórek w homeostazie, a nie proteom komórek poddanych stresowi oksydacyjnemu. Poza tym, czy tak znaczna liczba zidentyfikowanych partnerów białkowych nie jest efektem błędu metody analizy zbliżeniowej, cechującej się wysokim odsetkiem wyników fałszywie pozytywnych? Proszę o komentarz w tej sprawie podczas obrony.

Następnie, za pomocą bioinformatycznej metody BIOGRID Doktorant wykorzystał otrzymane dane do stworzenia sieci proteomicznych, i dalej, do analizy ontologii genów. Podejście bioinformatyczne oparte na analizie proteomicznej następczej generacji sprzężonej ze spektrometrią mas pozwoliło na zidentyfikowanie skupisk białek o najwyższym poziomie nadreprezentacji obejmujących białka kompleksu mRNP, białka rybosomalne, białka retikulum endoplazmatycznego i białka transportu pęcherzyków, oraz białka kompleksów jądrowych i mitochondrialnych. Najwyższy poziom nadreprezentacji dotyczył białek kompleksu dekapującego, a więc białek DCP2, DCP1A/B, EDC3 oraz EDC4 obecnych we wszystkich badanych stanach komórki oprócz bloku mitotycznego. Zdefiniowanie potencjalnych oddziaływań pomiędzy białkami kompleksu dekapującego Doktorant uzyskał za pomocą testów ko-immunoprecypitacji wykorzystując oryginalnie przygotowane plazmidy białek fuzyjnych DCP1 i DCP2 z metką GFP, eksprymowane w komórkach HEK273. W eksperymencie tym przebadał również możliwość tworzenia kompleksów trzech białek jądrowych UHRF1BP1, SMAD4 i CRKL, w tym dwóch pierwszych nadreprezentowanych w analizie zbliżeniowej. Niestety, otrzymane wyniki nie były istotnie znaczące dla składu kompleksu dekapującego. Podsumowując, Doktorant uzyskał wyniki potwierdzające wiele uprzednio obserwowanych mikroskopowych struktur ciałek P, których DCP2 jest integralnym komponentem. Jednocześnie zidentyfikował szereg białek reprezentujących możliwe, ale raczej słabe, wewnątrzkomórkowe interakcje DCP2 z różnymi organellami zachodzące w różnych warunkach stresu komórkowego. Odkrycia te, chociaż o obecnie o raczej umiarkowanej wadze, mogą stać się podstawą do dalszych badań funkcji i znaczenia białka DCP2 w różnorodnych procesach biologicznych.

Drugi cel cząstkowy, odnoszący się do rekonstrukcji kompleksu dekapującego i zbadania jego aktywności w warunkach *in vitro*, został osiągnięty poprzez realizację czterech zadań badawczych. Pierwsze z nich polegało na ekspresji i oczyszczaniu białek kompleksu dekapującego. Doktorant metodami inżynierii genetycznej wklonował do bakteryjnych wektorów ekspresyjnych geny (a nie sekwencje) kompletnych (o całkowitej długości) białek lub ich skróconych form obejmujących określone domeny, a następnie opracował warunki bakteryjnych hodowli oraz ekspresji i oczyszczania białek. Wykazał, że szczep bakteryjny Rossetta2 (DE3), posiadający potencjał zwiększenia ekspresji genów białek eukariotycznych zawierających rzadkie kodony, umożliwił ekspresję białek o wyższej integralności w porównaniu do pozostałych testowanych szczepów. Pokonując wiele problemów związanych z oczyszczaniem, agregacją i trwałością białek, sumarycznie otrzymał 3 warianty białka DCP2 z różnymi metkami (tutaj: "etykietami"), 4 warianty białka DCP1A (dwa pełnej długości i dwa obejmujące N-terminalną domenę EVH1 z motywem HLM lub bez, skrócone na C-końcu), białko EDC3 z różnymi metkami (6xHis-SUMO, GST i 6xHis-GFP) a także nietrwałe białko EDC4 oraz jego bardziej stabilną C-terminalną domenę. Wartością dodaną tych badań było otrzymanie białek ludzkich o pełnej długości, obejmującej nie tylko dobrze sfałdowane domeny, ale również regiony nieustrukturyzowane. Było to istotnie osiągnięcie, albowiem można było zanalizować oddziaływania pomiędzy terminalnie ułożonymi domenami funkcjonalnymi różnych partnerów białkowych kompleksu dekapującego. Wyniki zadania drugiego, opisane w punktach 3.3-3.5 pokazały, że pełnej długości białko DCP1A (otrzymane po raz pierwszy przez Doktoranta) ma tendencję do tworzenia nieustrukturyzowanych trimerów, wykazujących masę molekularną zbliżoną do teoretycznej masy trimery, co zostało potwierdzone, odpowiednio, metodami dichroizmu kołowego i chromatograficznego sączenia molekularnego z wielokątowym rozpraszaniem światła. Białko EDC3 występowało w postaci dimeru, zaś główny komponent kompleksu, białko DCP2, był monomerycznym i nie wykazywał tendencji do oligomeryzacji. Największym wyzwaniem okazało się uzyskanie białka EDC4 w formie monomerycznej, ponieważ białko pełnej

długości wykazywało silną tendencję do niekontrolowanej multimeryzacji przejawiającej się w szybkim tworzeniu form amyloidowych. W badaniach wykorzystana została także rekombinowana forma C-terminalnej części EDC4 (EDC4<sub>CT</sub>), o mniejszej tendencji do oligomeryzacji. Badania właściwości kompleksu dekapującego były metodologicznie bardzo wymagające, gdyż pomiary musiały być przeprowadzane na świeżych preparatach białkowych. Opracowane protokoły biosyntezy białek zostały wykorzystane do zbadania właściwości tych białek w systemie *in vitro* odizolowanym od innych czynników komórkowych. Metodami elektroforezy żelowej, dot blot, western i far western blot, oraz metodami interferometrycznymi szczegółowo zanalizowano oddziaływania pomiędzy różnymi wariantami białek pełnej długości, a także pomiędzy poszczególnymi domenami funkcjonalnymi wszystkich czterech komponentów kompleksu dekapującego.

Badania z powyższymi modelami pokazały, że białka DCP1A i EDC3 silnie i wzajemnie oddziałują ze sobą, ze stałą równowagi w zakresie mikromolowym dla oddziaływań pomiędzy domenami, odpowiednio, HLM i LSM. Dla oddziaływań pomiędzy białkami pełnej długości występującymi w formie, odpowiednio trimeru i dimeru, i wiążącymi się w stosunku innym niż 1:1 Doktorant musiał się zmierzyć z bardziej zaawansowanym modelem pomiarów interferometrycznych i stosownych obliczeń parametrów kinetycznych. Wykazał, że stała dysocjacji między tymi białkami mieści się w granicach nanomolowych, a co bardziej interesujące, kształt sensogramów BLI sugerował, że oddziaływania pomiędzy obydwoma białkami zachodziły nie tylko pomiędzy ich domenami funkcjonalnymi, ale także w obszarze ich nieustrukturyzowanych fragmentów. Kolejne badane oddziaływanie, pomiędzy DCP1A oraz DCP2, okazało się być relatywnie słabe, ze stałą dysocjacji w zakresie stężeń mikromolowych. DCP2 oddziaływało jedynie z EDC4 o pełnej długości oraz jego C-terminalną domeną  $\alpha$ -helikalną. Wiązanie DCP1A oraz EDC4 ściśle zależało od obecności DCP2, co sugeruje, że oddziaływanie to mogło być mediowane właśnie przez DCP2, chociaż w komórce być może jest uzależnione także od innych czynników. Doktorant w teście EMSA wykazał, że krótki transkrypt mRNA wiąże się w sposób multiwalentny z DCP2 i EDC3, tworząc kompleksy o różnej stechiometrii, natomiast z DCP1 wiąże się specyficznie, prawdopodobnie w stosunku jedna cząsteczka mRNA na jedną cząsteczkę białka.

Doktorant przeprowadził również modelowanie molekularne ustrukturyzowanych domen kompleksu dekapującego i porównał je ze strukturą kompleksu drożdżowego. Wyniki tych badań wykazały, że pomimo, że obydwa modele były do siebie zbliżone, to jednak część oddziaływań pomiędzy DCP1 i DCP2 w modelu ludzkim została utracona, co może tłumaczyć relatywnie słabe oddziaływania pomiędzy obydwoma białkami obserwowane w badaniach *in vitro*. Efektem przeprowadzonych badań jest zaproponowany przez Doktoranta model interakcji pomiędzy rekombinowanymi białkami kompleksu dekapującego, w którym platformą wiążącą składowe kompleksu jest białko EDC4, do którego bezpośrednio wiąże się monomeryczne białko DCP2, które z kolei jest prezentowane dla trimerycznego białka DCP1. Pomimo, że białko EDC3 nie wykazuje silnej interakcji z EDC4, to jednak w tej pracy rozważana jest możliwość stabilizacji przez ten składnik kompleksu EDC4-DCP2-DCP1. Doktorant trafnie skomentował, że organizacja ludzkiego kompleksu dekapującego jest relatywnie słabo poznana, jednakże przyznaje, że dotychczasowe doniesienia nie są do końca spójne z zaproponowanym przez niego modelem, np. w drożdżowym kompleksie zaobserwowano oddziaływania białka Pdc-1 (analogu ludzkiego EDC4) z EDC3, a w innych badaniach potwierdzono oddziaływania pomiędzy domeną LSM z EDC3 i białkiem EDC4. Zaobserwowane różnice wynikają prawdopodobnie z różnych warunków tworzenia i obserwacji kompleksów, jednak pokazują, że ustalenie dokładnej struktury kompleksu dekapującego wymaga dalszych badań.

Mając w ręku wszystkie komponenty kompleksu dekapującego Doktorant w kolejnym zadaniu pokusił się o scharakteryzowanie aktywności enzymu dekapującego DCP2 w stosunku do różnych wariantów krótkiego mRNA (m7GpppA/G-N24/25/31), w obecności różnych aktywatorów, w tym kolejnych partnerów kompleksu dekapującego, różnego stężenia NaCl czy też obecności różnych dwuwartościowych jonów w buforze reakcyjnym. Zbadał także wpływ sekwencji i struktury 5'-końca mRNA na aktywność dekapującą DCP2. Uzyskał szereg interesujących danych dla ludzkiego białka DCP2, m.in. wyższą aktywność enzymu w obecności jonów manganu niż magnezu, hamowanie aktywności w podwyższonych stężeniach NaCl, preferencyjną hydrolizę kapu związanego z nukleotydem A niż z G. Ponadto, wykazał znaczną zależność aktywności DCP2 od struktury drugorzędowej terminalnej domeny mRNA. Co więcej, kompletny cztero-składnikowy kompleks dekapujący okazał się być znacznie bardziej aktywny niż dwuskładnikowe mieszaniny DCP2 z wybranym, jednym z trzech, komponentem kompleksu. Uzyskane dane wzbogaciły wiedzę w stosunku do tej wcześniejszej, uzyskanej głównie na ortologach drożdżowych lub ze skróconymi wariantami ludzkiego białka DCP2. W badaniach dynamiki hydrolizy kapu w różnych kombinacjach trzech enzymów kompleksu dekapującego Doktorant otrzymał dosyć zaskakujące wyniki, które w świetle zaproponowanego wcześniej modelu oddziaływań wydają się niespójne. Proszę Doktoranta o opinię, dlaczego kompleks DCP2 z białkami EDC3 i EDC4<sub>CT</sub> jest najbardziej aktywny w reakcji dekapowania, skoro w zaproponowanym tutaj modelu białko EDC3 nie wiąże się bezpośrednio ani z centralnym EDC4 ani z enzymatycznym DCP2.

W końcowym fragmencie rozprawy Doktorant poszukiwał odpowiedzi na pytanie, czy białka rekombinowanego kompleksu dekapującego, wchodzącego w skład ciałek P wykazują zdolność do separacji faz w warunkach *in vitro*. W tym celu przeprowadził obserwacje mikroskopowe fluorescencyjnie znakowanych białek EDC3, DCP1 i DCP2. Wykazał, że tylko białko EDC3 w miarę wzrostu stężenia wykazuje silną tendencję do separacji faz, którą można indukować lub hamować poprzez wzbogacanie roztworu glikolem polietylenowym, 1,6-heksandiolem czy NaCl. Białka DCP1A i DCP2 nie wykazywały zdolności do samoistnej separacji faz, natomiast wbudowywały się do kondensatów EDC3, oraz do roztworu GFP-EDC3 z dodatkiem nieznakowanego EDC4<sub>CT</sub>. Ciekawe, że w takiej sytuacji DCP1A i DCP2 wiązały się lepiej do składowej niefluorescencyjnego EDC4<sub>CT</sub> niż do EDC3, co potwierdzało wcześniej zaproponowany przez Doktoranta model kompleksu dekapującego. Co więcej, pomimo, że czynnik EDC4<sub>CT</sub> wykazywał skłonność do tworzenia struktur makroskopowych, to jednak rozgałęzione żele EDC4<sub>CT</sub> ulegały dysocjacji w obecności PEG i nie uzyskano jednoznacznych wskazań, że w testowanych warunkach następowała separacja faz. Doktorant słusznie sugeruje, że obserwowana zdolność EDC4 do tworzenia kondensatów o właściwościach wiskoelastycznych może wspomagać jego funkcję jako molekularnego rusztowania w ciałkach P.

W rozdziale **Dyskusja** Doktorant dogłębnie przeanalizował otrzymane wyniki, wskazał obszary, które wymagają dalszej eksploracji, oraz podkreślił wielokierunkowość zaobserwowanych kontaktów białka DCP2 w różnych warunkach stresu w komórce. Zauważył, że konserwatywny czteroskładnikowy kompleks dekapujący w warunkach komórkowych tworzy gęstą sieć oddziaływań poprzez swoje regiony inherentnie nieuporządkowane. Podkreślił fakt uzyskania eksprymowanych białek pełnej długości, dzięki czemu mógł uzyskać dowód, że stan oligomeryczny kompleksu dekapującego jest kluczowy dla oddziaływań pomiędzy jego poszczególnymi komponentami. Zaproponował nowy model oddziaływań międzycząsteczkowych w kompleksie dekapującym, w którym białko EDC4 oligomeryzujące w makroskopowe sieci stanowi fundament kompleksu. Przedyskutował aspekty enzymatycznej aktywności DCP2 w zależności od struktury RNA i wiązania czynników dekapujących.

W tym przypadku, bardzo trafnie zastanawiał się nad możliwym mechanizmem regulacji ekspresji genów na poziomie ciałek P poprzez powstawanie drugorzędowych elementów strukturalnych mRNA.

Finalnie, w krótkim tekście zatytułowanym **Perspektywy** Doktorant wskazał kierunki dalszych badań dotyczących funkcji DCP2 w komórce, jego ewentualnej relokacji i oddziaływania z białkami odległych kompartmentów i organelli, udziałem w procesach degradacji mRNA, czy też interakcji DCP2 w ciałkach P z powierzchnią błony mitochondrialnej. Wskazał na możliwości wykorzystania zaawansowanych technik analitycznych, takich jak spektroskopia NMR w roztworze i ciele stałym czy też wymiana izotopowa wodór-deuter sprzężona ze spektrometrią mas i wsparta technikami modelowania molekularnego do badania dynamicznych zmian zachodzących w strukturze i oddziaływaniach regionów inherentnie nieuporządkowanych w białkach kompleksu dekapującego.

Podsumowując rozprawę pod względem „technicznym” stwierdzam, że dla przeprowadzenia zaplanowanych doświadczeń Doktorant wykonał tytaniczną pracę laboratoryjną. Wszystkie zastosowane materiały i metody opisał wyczerpująco w rozdziale 4. Wygenerował połowę spośród 30 zastosowanych wektorów ekspresyjnych. Wszystkie je poddał ekspresji bądź to w systemie bakteryjnym bądź w komórkach ludzkich. Dla potrzeb eksperymentów biotynylacji zbliżeniowej wyprowadził dwie stabilne linie komórkowe ekspresyjną ligazę biotynylową, także w fuzji z białkiem DCP2. Wykazał się znajomością technik izolowania i oczyszczania białek, techniki pull-down do analizy oddziaływań międzybiałkowych, metod elektroforetycznych analizy mobilności białek, technik western-blot i dot-blot. Doktorant posiada umiejętność obrazowania mikroskopowego separacji faz w roztworach komórek i preparatów białkowych, zapoznał się z analizą kinetyki oddziaływań międzybiałkowych metodą interferometrii biowarstwowej i opanował metodę wyznaczenia parametrów fizykochemicznych tych oddziaływań. W badaniach struktury białek zastosował chromatografię wykluczania SEC-MALS, spektroskopię CD, analizę preparatów za pomocą spektroskopii fluorescencyjnej, a także analizę mobilności elektroforetycznej kompleksów RNA-białko za pomocą techniki EMSA. Jest również ekspertem w zakresie metod syntezy i analizy transkryptów RNA/mRNA. I finalnie, wykazał się znajomością zaawansowanych technik bioinformatycznych zastosowanych do interpretacji wyników biotynylacji zbliżeniowej oraz do modelowania molekularnego kompleksów białkowych. W opisie metod zabrakło mi jedynie informacji o zastosowanych metodach statystycznych.

W końcowej ocenie rozprawy, z racji pełnionej funkcji recenzenta chciałabym zwrócić uwagę Doktoranta na pewne nieprecyzyjne wyrażenia w tekście rozprawy, które jednak nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy i w większości nie wymagają komentarza podczas obrony.

Uwagi generalne:

- Moim zdaniem, określenie „Rycina” a nie „Rysunek”, byłoby bardziej trafne, dla opisu nie tylko rysunków, ale także schematów, fotografii mikroskopowych czy żeli elektroforetycznych, wykresów, struktur wymodelowanych białek itd.
- w tekście wielokrotnie brakowało odnośnika do wyników zobrazowanych w zamieszczonej ilustracji (np. Rys. 3.10, 3.14).
- w wielu przypadkach słowo sekwencja było użyte nieprawidłowo, jako fragment, gen czy długość, itd. Np.: „amplifikacja sekwencji białka”

Str. 30, proponuję używać sformułowania „ w regionie 3' mRNA” zamiast „na regionie 3' mRNA”

Str. 31. Zamiast „człon entropijny” powinno być „człon entropowy”

Str. 31. Organellum to l. poj. Organelle – l. mnoga. Zatem w podpisie Rys. 1.4. powinno być ...”i inne niebłoniaste organelle.”

Str. 34. zamiast „grona białek” może lepiej byłoby użyć mniej kolokwialnego sformułowania „puli białek”

Str. 41. Co Doktorant miał na myśli pisząc, że „proces rekrutacji kompleksu dekapującego jest koordynowany przez sieć redundantnych oddziaływań”? „Redundantny” to nadmiarowy, niepotrzebny, zbędny, zbyteczny. Czy taka była intencja powyższego sformułowania?

Str. 46: „konserwacja motywu” i dalej str. 49: „Niski poziom konserwacji” to wyrażenia według mnie niepoprawne. Czy może lepiej użyć termin „konserwatywności” lub „zachowawczości”? i dale Str. 61: Nie jestem pewna, czy wyrażenie „enzym jest wysoce zachowany” jest poprawne. Czy nie byłoby bardziej poprawnie użyć tutaj wyrażenia „enzym jest wysoce zachowawczy”, lub „enzym jest wysoce konserwatywny”?

Str. 68: Jeśli już używamy angielskiego słowa *chaperons* w formie spolszczonej, to użyjmy słowa „chaperony” zamiast „szaperony” (a po polsku „białka opiekuńcze”)

Str. 79: Niepełne ostatnie zdanie.

Str. 122: powinno być „w gradiencie sacharozy” a nie „w gradiencie sukrozy”

Str. 124: Czy nie lepiej / poprawniej byłoby zastosować określenie „potranskrypcyjna metylacja adeniny” niż „epitranskryptomiczna metylacja adeniny” ?

Mam też uwagę odnośnie rozdziału **Bibliografia**. Otóż, podziwiam Doktoranta za ilość pracy, jaką włożył w swoiste sformatowanie odnośników literaturowych. Zwłaszcza to formatowanie „W:” odnoszące się do angielskiego „in:”, które zazwyczaj jest stosowane w cytowaniach odnośników do książek, natomiast tutaj po raz pierwszy spotkałam taki format w cytowaniach publikacji. Podobnie jest ze spójnikiem „i” (ang. *and*), czy „i in.” w znaczeniu „*et al*”. W formatach czasopism nie używa się także skrótu dla strony „s.”. Oczywiście, zastosowany przez Doktoranta format jest akceptowalny bo jednoznaczny i w całym tekście konsekwentny. Tylko szkoda czasu, gdy głowa pełna nowych wyzwań.

### **Podsumowanie**

Doktorant wykazał się szeroką wiedzą w tematyce rozprawy doktorskiej i w pełni zrealizował ambitne cele badawcze uzyskując wiele oryginalnych wyników dotyczących struktury i funkcji ludzkiego kompleksu dekapującego uzyskanego w wyniku odtworzenia *in vitro* z rekombinowanych białek trzonu kompleksu. Szczegółowo zbadał interakcje pomiędzy poszczególnymi białkami o pełnej długości i ich krótszymi wariantami. Zaproponował oryginalny model kompleksu dekapującego, wskazał rolę poszczególnych białek w jego strukturze i funkcji. Wszelkoniemnie opisał wpływ poszczególnych składowych kompleksu na aktywność dekapującą białka DCP2, także w stosunku do różnych wariantów cząsteczki mRNA. Uzyskał szereg wartościowych wyników odnośnie oddziaływań enzymu dekapującego z różnymi organellami komórkowymi w warunkach homeostazy i w różnych stanach stresowych komórki. Znaczną część uwagi poświęcił badaniom nad skłonnością białek kompleksu dekapującego, stanowiącego integralną część ciała P, do przechodzenia w stan separacji faz. Uzyskał dowody, że nieustrukturyzowane fragmenty białek mają istotne znaczenie dla oddziaływań międzybiałkowych. Wykazał się szeroką wiedzą w zakresie literatury przedmiotu, znakomicie ustosunkował się do wcześniejszych danych literaturowych. Wskazał potencjalne kierunki badań, które mogą doprowadzić do pogłębienia wiedzy na temat



kompleksu dekapującego i jego zaangażowania w wielokierunkowe aktywności w metabolizmie komórki.

Praca jest eksperymentalnie obszerna, przeprowadzona rzetelnie i zgodnie z wysokimi standardami naukowymi. Wachlarz zdobytej wiedzy i umiejętności praktycznych spełnia z naddatkiem wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Doktorant udokumentował znajomość zarówno typowych jak i zaawansowanych metod analitycznych, włącznie z metodami znakowania zbliżeniowego oraz interferometrii biowarstwowej, z bardzo zaawansowaną metodologicznie obróbką danych. Praca została napisana bardzo klarownie i poprawnym językiem polskim, zarówno pod względem merytorycznym, jak i gramatycznym. Wyniki analiz zostały starannie zanalizowane i zilustrowane na odpowiednich rycinach i w tabelach. Rozprawa cechuje się porządnie opracowaną szatą graficzną, zawiera jedynie nieliczne błędy gramatyczne i językowe.

Tutaj warto też wspomnieć, że Doktorant jest współautorem trzech publikacji naukowych opublikowanych w czasopismach z listy JCR oraz czterech komunikatów konferencyjnych w formie plakatów. Ostateczną weryfikacją wartości merytorycznej zawartego w rozprawie materiału badawczego będzie jego opublikowanie w trzech wymienionych tutaj publikacjach w przygotowaniu. W mojej opinii Pan mgr. Inż. Michał Tyras zrealizował założone cele badawcze, otrzymał wiele oryginalnych wyników w oparciu o własne modele badawcze, wykazał się szeroką wiedzą w zakresie białek uczestniczących w dekapingu i degradacji RNA, wskazał kierunki potencjalnych badań nad rozwojem tematyki związanej z białkami degradacji mRNA.

#### *Wniosek końcowy*

Na podstawie wyżej omówionych osiągnięć stwierdzam, że przedstawiony mi do oceny materiał spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z Ustawą z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668). Wnioskuje do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warszawskiego, o dopuszczenie Pana mgr. inż. MICHAŁA TYRASA do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Jednocześnie, ze względu na wysoki poziom przeprowadzonych badań i uzyskanie wartościowych oryginalnych wyników, wsparte szeroką wiedzą w tematyce rozprawy a także obszernym materiałem doświadczalnym i metodycznym, wskazującym na wielkie zaangażowanie mgr. inż. Michała Tyrasa w realizację zadań badawczych, wnioskuje o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej i stawiam stosowny wniosek do rozpatrzenia przez Radę Naukową Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warszawskiego.

Z poważaniem,

Barbara Nawrot