

Kraków, 3.01.2025

Prof. dr hab. Grażyna Ewa Ptak  
Małopolskie Centrum Biotechnologii  
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

### Recenzja rozprawy doktorskiej

Imię i nazwisko kandydata: **mgr Michał Brouze**

Tytuł rozprawy doktorskiej: **Analiza roli wybranych egzorybonukleaz i polimeraz poli(A) u myszy domowej**

Promotor: **Prof. dr hab. Andrzej Dziembowski**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi kompilację trzech prac badających rolę regulacji RNA we wczesnym rozwoju, ze szczególnym odniesieniem do roli poliadenylacji RNA w gametogenezie. Dwie prace zostały opublikowane w czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania. Trzecia, zakończona praca, nie została jeszcze opublikowana.

1. **Wartość naukowa rozprawy**  
a. Oryginalność badań:

Recenzowana przeze mnie rozprawa jest komplikacją prac badawczych o wysokim stopniu oryginalności. Nowatorskie badania Pana Michała Brouze naświetliły rolę polimeraz poli(A) w oogenezie i spermatogenezie i wykazały różnice w metabolizmie ogona polimeraz poli(a) w gametach w porównaniu do komórek somatycznych. Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji **rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego**. Niewątpliwie wysoki poziom nowatorstwa prac jest odpowiednio nakreślony w rozprawie. Innowacyjność przeprowadzonych badań dodatkowo potwierdza fakt, iż prowadzone były w ramach bardzo prestiżowych projektów finansowanych przez European Research Council oraz przez Fundację Nauki Polskiej, jak i to, że prace zostały opublikowane w czasopismach o wysokim wskaźniku oddziaływania (Nature Communications oraz Scientific Data).

b. Wartość naukowa rozdziałów/artykułów:

Opublikowane prace wskazują na duży stopień nowatorstwa, zarówno w odniesieniu do badanego tematu jak i licznych, czasem bardzo skomplikowanych, metod zastosowanych przez

kandydata w przeprowadzanych doświadczeniach. Opublikowane dwie prace stanowiące rozprawę doktorską wykazały że polimerazy poli(A)z rodziny TENT-5 są niezbędne w gametogenezie, zapewniając funkcjonalność oocytu i plemnika. Trzecią pracę określającą rolę egzorybonukleazy DIS3L w rozwoju zarodka należy uzupełnić w odniesieniu do brakującej liczebności zarodków i zwierząt użytych w doświadczeniu (szerszy komentarz poniżej). Podsumowując całość, wartość naukową przedstawionych do recenzji prac oceniam **pozytywnie**.

## 2. **Wartość merytoryczna rozprawy**

Rozprawa doktorska stanowi wyczerpującą odpowiedź na problem zdefiniowany w tytule. Doktorant poprawnie opisał istotność problemu badawczego. Wstęp odpowiednio wprowadza w tematykę badań. Kandydat zrealizował postawione w ramach rozprawy cele przy użyciu odpowiednich, nowatorskich metod badawczych. Stwierdzam że Pan Michał Brouze jest w stanie zaprojektować proces badawczy, dobrać odpowiednie metody i narzędzia statystyczne i w prawidłowy sposób z nich korzystać. Nie mam zastrzeżeń do zastosowanych metod badawczych oraz analiz wyników. Stwierdzam, że doktorant poprawnie przeprowadził badania. Piśmiennictwo zastosowane w ramach rozprawy doktorskiej jest właściwie dobrane i wskazuje na dobre rozeznanie w światowej literaturze związanej z prowadzonymi badaniami. Analiza źródeł literaturowych przeprowadzona została w odpowiedni sposób, świadczący o dobrych kompetencjach autora i znacznej znajomości podjętej tematyki.

Na podstawie przedstawionej mi do recenzji kompilacji stwierdzam, że doktorant posiada duży zakres wiedzy teoretycznej i praktycznej w zakresie dyscypliny nauk biologicznych obejmujący biologię molekularną i komórkową oraz biologię rozwoju.

## 3. **Poprawność redakcyjna rozprawy**

Zastosowany układ rozprawy nie daje pełnej możliwości zrozumienia znaczenia uzyskanych wyników. Zredukowany opis odnoszący się do całości kompilacji (z wyłączeniem dobrze zarysowanego wstępu) ogranicza recenzentowi możliwość ewaluacji zdolności poznawczych i interpretacyjnych kandydata. Wstęp został wprawdzie ujęty szeroko, jednak z uwagą na *nieprecyzyjny zarys celu przewodniego pracy*, trudno jest zrozumieć co łączy pierwsze dwie pierwsze prace z trzecią. Każda z prac opisana jest osobno i nie został wysnuty główny wniosek obejmujący całość rozprawy, będącej przecież kompilacją trzech prac, a nie trzema pojedynczymi pracami. Taki styl rozprawy zmusza czytającego do zawężenia ewaluacji do samych prac (opublikowanych lub w przygotowaniu), które choć ocenione generalnie pozytywnie, są przecież autorstwa wielu badaczy, łącznie z promotorem Pana Michała Brouze. To z kolei ogranicza możliwość jednoznacznego określenia przez recenzenta, czy i w jakim stopniu kandydat jest zdolny do samodzielnej interpretacji i formułowania wniosków ogólnych. Dlatego sugeruję przedstawienie głównego wniosku przez kandydata podczas obrony publicznej.

#### 4. Uwagi krytyczne

W trzeciej z prac stanowiących kompilację należałoby zweryfikować radykalne stwierdzenia dotyczące braku możliwości rozwoju *Dis3l* knock-outów (KO) w świetle uzyskanych wyników. Nie można opierać stwierdzenia o umieralności zarodków *Dis3l*<sup>-/-</sup> w 6.5 dniu rozwoju na podstawie bardzo niewielkiej ilości obserwacji, dodatkowo dość nieprecyzyjnych. W wynikach mowa jest, że w 6.5 dniu rozwoju uzyskano w sumie 3 zarodki KO (z których tylko 2 określone są jako *mniejsze i zdeformowane*), a w kolejnym dniu, 6 zarodków KO, określonych jako *zdegenerowane*. Co istotne, liczebność uzyskanych zarodków kontrolnych jest niedostateczna do wysnucia jednoznacznego wniosku co do zwiększonej śmiertelności zarodków KO. Do jednej biorczyni transferuje się średnio ok. 10-14 zarodków myszy. Tak jest na ogół, jednak w recenzowanej pracy *brakuje również informacji o liczbie zarodków transferowanych do biorczyń*. Biorąc pod uwagę podane liczebności (opieram się tutaj na liczbie zarodków kontrolnych uzyskanych po transferze), można domniemywać, że *doświadczenie nie było wykonane przy użyciu odpowiedniej ilości zarówno zarodków jak i samic biorczyń*. Jeśli doświadczenie nie zostało przeprowadzone na dostatecznej ilości zwierząt, to wówczas mniejszy rozmiar, czy, jak to określono, „degeneracja” kilku zarodków nie powinna być jednoznacznie przypisywana charakterowi samego zarodka KO. Co więcej, procedura transferu wykonana przy użyciu niedostatecznej liczebności zarodków i biorczyń nie pozwala na arbitralne stwierdzenie co do wczesnej umieralności zarodków KO. Na przeżywalność transferowanych zarodków może mieć wpływ wiele czynników, a umieralność zarodków po transferze jest generalnie dość wysoka, zwłaszcza we wczesnym okresie post-implantacyjnym. Dlatego odpowiednia ilość użytych zwierząt jest niezbędną do tego typu doświadczeń. Tym bardziej w tym przypadku, gdzie nie wykryto przecież radykalnych różnic w zarodkach w 4.5 dniu rozwoju. Brak określenia liczby dawczyń i biorczyń w doświadczeniu stanowi istotne niedociągnięcie.

Nie wiadomo również co określenie zarodki „zdeformowane” czy „zdegenerowane” oznacza, ponieważ zarodki nie były w zasadzie analizowane, co wynikałoby z braku odpowiedniego opisu w sekcji materiałów i metod. Na końcu pracy wspomniana jest z kolei rzekoma „rozległa apoptoza” zarodków, choć przecież ta, nie była w żaden sposób badana. W każdej pracy postulującej umieralność zarodków lub komórek, a szczególnie w rozprawie doktorskiej, odpowiednio precyzyjny opis metod użytych do wykazania śmiertelności zarodka powinien być zawarty.

Stwierdzenia odnoszące się do czasu rzekomego zamierania zarodków KO są równie nieprecyzyjne. Na początku, tj. w tytule opisu wyników określono, że zarodki *Dis3l*<sup>-/-</sup> umierają w 6.5 dniu rozwoju (użyto wyrazu: ang. „embryos die at E.6.5”), choć tego przecież nie wykazano w doświadczeniu. Dalej w tekście czytamy, że zarodki umierają przy implantacji (użyto wyrazu: ang. „at implantation”, a to oznaczałoby E4.5- 5.0), a na końcu pracy, że umierają po 6.5 dniu rozwoju (użyto wyrazu: ang. „embryo death after day E6.5”).

#### 5. Ocena końcowa

Rozprawa doktorska mgr Michała Brouze, w postaci kompilacji trzech prac, stanowi oryginalne źródło wiedzy o regulacji RNA w gametogenezie. Przedstawioną mi do recenzji rozprawę doktorską

oceniam pozytywnie. Wspomniane wyżej niedociągnięcia w jednym z doświadczeń nie wpływają znacząco na wyrażaną przeze mnie pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej kandydata. Rozprawa spełnia wymagania formalne określone w obowiązujących przepisach. Jej tematyka zawiera się w aktualnej dyscyplinie: nauki biologiczne.

Ja, niżej podpisana stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska Pana Michała Brouze spełnia warunki określone w art. 13.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami) i wnioskuję do Komisji Doktorskiej Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie o dopuszczenie mgra Michała Brouze do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

3.01.2025

A handwritten signature in blue ink, consisting of a long horizontal stroke followed by a more complex, stylized flourish.

data sporządzenia recenzji

podpis recenzenta