

30 grudnia 2024

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Michała Brouze pt.
„Analysis of the role of selected exoribonucleases and poly(A) polymerases in Mus musculus”**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Michała Brouze została wykonana po kierunku Prof. dr hab. Andrzeja Dziembowskiego z Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie.

Ocena wartości naukowej:

U eukariontów, oddzielenie translacji od transkrypcji poprzez otoczkę jądra komórkowego umożliwia modyfikowanie dojrzałych transkryptów, wpływając na ich trwałość. Stabilność poszczególnych transkryptów mRNA decyduje o ich ilości w danej chwili, co z kolei jest jednym z najważniejszych czynników kontrolujących wydajność translacji. Stabilność RNA zależy od obecności i struktury modyfikacji na obu końcach transkryptu: 1.) od strony 5' od tzw. 5' kap (ang. "5' cap") zbudowanego z 7-metyloguanozyny (m7G) połączonej mostkiem 5',5'-trifosforanowym z pierwszym transkrybowanym nukleotydem i 2.) od strony 3' RNA ogona poli(A). Ilość adenin na końcu 3' transkryptu wpływa zarówno na wydajność translacji, jak i stabilność RNA - transkrypty z krótkimi ogonami poli(A) poniżej 20 nukleotydów są degradowane przez komórkowe egzorybonukleazy. Długość ogona poli(A) jest wypadkową przeciwnego działania szeregu polimeraz poli(A) oraz egzorybonukleaz. Kompleksy polimeraz poli(A) oraz egzorybonukleaz wykazują różny poziom aktywności w zależności od typu komórek i tkanek oraz etapu rozwoju organizmu, co jest ważnym elementem regulacji ekspresji genów.

Cel pracy:

Celem pracy było zbadanie nowych aspektów regulacji transkryptomu poprzez modyfikację stabilności poszczególnych transkryptów na drodze poliadenylacji oraz degradacji RNA. Cele szczegółowe: 1) zbadanie roli polimeraz poli(A) TENT5 w oogenezie oraz 2) roli egzorybonukleazy DIS3L, podjednostki katalitycznej cytoplazmatycznego egzosomu w embriogenezie myszy. **Tematyka pracy jest ważna, ponieważ role ww. białek były w tych kontekstach wcześniej nieopisane, a ich poznanie jest ważne nie tylko z punktu widzenia biologii molekularnej i biologii rozwoju, ale także medycyny.**

Metody badawcze:

W celu zbadania funkcjonalnego znaczenia polimeraz poly(A) TENT5 doktorant wykonał szereg różnorodnych eksperymentów z wykorzystaniem myszy TENT5 knock-out, Tent5bGFP knock-in oraz typu dzikiego. Pogłębiona analiza fenotypowa obejmowała m.in. testowanie dojrzewania oocytów, charakterystykę jajowodów, immunofluorescencję połączoną z mikroskopią. Zmiany w długości ogona

poly(A) zbadano za pomocą analiz bioinformatycznej długich odczytów uzyskaną za pomocą bezpośredniego sekwencjonowania RNA trzeciej generacji – Oxford Nanopore. Wyniki dla wybranych transkryptów potwierdzono za pomocą testu PCR Poly(a) (PAT). Bezpośrednie sekwencjonowanie Nanopore wymaga dużej ilości RNA, dlatego użyto materiału z całych jajników. Odczyty należące do oocytów zidentyfikowano przy pomocy dodatkowego, konwencjonalnego RNA-seq'a opartego o sekwencjonowanie drugiej generacji (NGS, Illumina). Wpływ zależności regulacji TENT5 od obecności sygnału kierującego transkrypty do retikulum endoplazmatycznego sprawdzano za pomocą mikroiniekcji reporterowego mRNA. Druga praca wchodząca w skład pracy doktorskiej może zostać uznana za kontynuację analizy poliadenylacji przy użyciu Nanopore. Praca nad poznaniem funkcji DIS3L wymagała również analizy transgenicznych myszy a także chimer embrionów. W tej pracy doktorant wykonał również częściowo analizę wyników RNA-seq. Co ważne, doktorant poza wykonaniem kluczowych eksperymentów pełnił również ważną rolę w pisaniu wszystkich trzech manuskryptów. **Bardzo wysoko oceniam jakość wykonanych eksperymentów, adekwatność doboru metod oraz ich różnorodność – ich kombinacja pokazała w przekonujący sposób rolę TENT5B/C w poliadenylacji transkryptów w oocytach oraz ich znaczenie dla ich dojrzewania.**

Uzyskane wyniki:

U większości komórek gross poliadenylacji zachodzi w jądrze, a krótki ogon poli(A) w cytoplazmie predestynuje mRNA do degradacji. Gametogeneza oraz synapsy neuronów są odstępstwem od tej reguły – de-adenylowane mRNA jest utrzymywane w nieaktywnej formie w cytoplazmie. RNA to ulega adenylacji przez niekanoniczne cytoplazmatyczne polimerazy poli(A) na 3' końcu w czasie, gdy potrzebna jest translacja kodowanych przez nie białek. Jest związane z osiągnięciem odpowiedniego etapu różnicowania się komórek. Wiedza na temat kompleksów molekularnych zaangażowanych w ten proces była ograniczona. Niedawno w laboratorium Prof. Dziembowskiego odkryto nową rodzinę polimeraz poli(A): białka TENT5 składającą się z czterech członków, których funkcje w oogenezie i spermatogenezie zostały zbadane w ocenianej pracy doktorskiej. Otrzymane wyniki, wskazują jednoznacznie na niezbędność białek TENT5B/C w oogenezie oraz wskazują na ich specyficzność do białek produkowanych przez rybosomy związane z retikulum endoplazmatycznym, wydzielanych na zewnątrz komórki. Zidentyfikowane zostały także białka, które są regulowane przez TENT5B/C: GDF9 i ZP3 - pełniące ważną rolę w oogenezie. Wpływ pozostałych członków rodzin TENT5 na oogenezę, spermatogenezę oraz płodność myszy został również określony. Rezultaty przedstawione w pierwszym manuskrypcie to przekonujący zestaw komplementarnych eksperymentów, które wypełniają lukę w rozumieniu cytoplazmatycznej poliadenylacji i pozwalają na stawianie kolejnych pytań, które będą przedmiotem dalszych badań. Nowatorska analiza składu nukleotydowego końców 3' RNA pochodzącego z mysich jajników i jąder w drugiej publikacji jest ważnym, komplementarnym uzupełnieniem opisanych wyżej badań. Sugeruje ona funkcjonalne znaczenie zaobserwowanych wzorów rozmieszczenia nukleotydów innych niż adeniny w ogonie poli(A) uwzględniając nukleotydy urydylowane. Trzecia praca, która została opublikowana, póki co w formie preprintu analizuje funkcje

cytoplazmatycznej egzonukleazy 3'-5' DIS3L. Eksperymenty na embrionach mysich pozbawionych tego enzymu pokazały, że jest ona niezbędna dla rozwoju myszy poza 7 dzień rozwoju. Zostały również scharakteryzowane transkrypty, które akumulują się u macierzystych komórek embrionalnych (mESCs) pozyskanych embrionów DIS3L knock-out. Wskazano, że akumulacja ta nie powoduje wzrostu produkcji kodowanych przez nie białka co po części wynika z faktu, że globalna synteza białek w tych komórkach jest obniżona. Są to pierwsze badania nad funkcją DIS3L, które istotnie pogłębiają wiedzę na temat roli tego białka w rozwoju, choć pełne zrozumienie mechanizmu działania DIS3L i specyfiki dobierania jego substratów będzie wymagało wiele więcej pracy. **Podsumowując uzyskane wyniki są bardzo wysokiej jakości, w przekonujący sposób, w dużym stopniu wyjaśniają rolę jaką pełnią polimerazy poli(A) TENT5 oraz egzonukleaza DIS3L w badanych kontekstach biologii rozwoju.**

Zastosowanie uzyskanych wyników badań.

Wyniki otrzymane przez mgr Brouze zostały już opublikowane i jestem przekonany, że spotkają się z dużym zainteresowaniem społeczności naukowej. Uzyskane dane bioinformatyczne będą mogły być re-analizowane przez inne grupy badawcze, a stworzone linie myszy transgenicznym, plazmidy, oligonukleotydy przyczynią się do dalszych badań nad stabilnością RNA. Badania umożliwiły odkrycie nieznanego wcześniej sposobu regulacji ekspresji grupy genów ważnych dla różnicowania plemników oraz komórek jajowych, co poszerzyło nasze rozumienie tych procesów oraz może mieć wpływ na diagnozę oraz leczenie bezpłodności. Uzyskana wiedza może też pomóc w walce z niektórymi rakami i chorobami neurodegeneracyjnymi do których przyczynia się błędne działanie badanych kompleksów. Odkrycie, że poliadenylacja zależna od TENT5 jest szczególnie ważna dla transkryptów kierowanych do retikulum endoplazmatycznego pozwoliło na lepsze zrozumienie innego odkrycia grupy badawczej Prof. Dziembowskiego - TENT5-zależnego wzmocnienia stabilności szczepionek mRNA anty COVID-Sars-2. Podobne znaczenie mogą mieć wyniki pochodzące z analizy sekwencji transkryptów pochodzących z bezpośredniego sekwencjonowania RNA, co wskazuje na dodatkową warstwę regulacji stabilności transkrypcji poprzez ilość i rozmieszczenie innych poza adeniną nukleotydów.

Ocena formalnej strony pracy:

Praca doktorska składa się z cyklu powiązanych tematycznie trzech publikacji poprzedzonych streszczeniem w języku angielskim i polskim, zwięzłym 6-stronicowym wprowadzeniem, opisem celu pracy, spisem literatury użytej we wprowadzeniu oraz podsumowaniem wyników prezentowanych w poszczególnych manuskryptach. Ponieważ zasadniczą częścią pracy doktorskiej są opublikowane wielo-autorskie artykuły naukowe, istotną częścią pracy jest wyszczególnienie jaki był udział doktoranta w ich powstawaniu. Wprowadzenie, mimo, że bardzo zwięzłe stanowi wystraszające podsumowanie aktualnego stanu wiedzy na temat roli poliadenylacji RNA oraz związanej z nią selektywnej degradacji w regulacji transkrypcji w trakcie rozwoju embrionalnego. We wprowadzeniu do pracy zacytowano 95 prac naukowych, co jest sporą liczbą na tak krótki tekst. Co bardziej ważne cytowane prace są adekwatne merytorycznie, opublikowane przez rozpoznawalne w tematyce badawczej grupy i w wielu

wypadkach publikowane w najbardziej prestiżowych czasopismach naukowych. Dodatkowo 85, 37 i 49 artykułów zostało zacytowane w załączonych pracach. Podobnie jak przy wstępie ich dobór był adekwatny i merytorycznie uzasadniony, a liczba była zapewne kompromisem, między potrzebą oraz limitami formatu czasopisma. **Uważam, że układ tekstu jest przejrzysty, zawiera wszystkie niezbędne elementy oraz format zlecane przy pracy doktorskiej składającej się z cyklu artykułów badawczych.**

Uwagi krytyczne:

Uwagi, wymagające wyjaśnienia, dotyczące artykułu opublikowanego w Nature Communications:

- Z Fig. 1B wynika, że samiec TENT5C KO nie jest płodny, podczas, gdy samiec TENT5B/C DKO jest płodny – proszę o wyjaśnienie - trudno uwierzyć, że usunięcie dodatkowego członka TENT5 powoduje przywrócenie płodności mutantowi TENT5C
- Dane pokazane na Fig. 3D-G w mojej opinii pokazują zaburzenia w segregacji chromosomów i uważam, że określanie tego jako „chromatin-organization abnormalities”, jest mylące, choć nie jest to też z pewnością wielki błąd. Proszę o uzasadnienie, dlaczego zdecydowano się na eksponowanie chromatyny a nie chromosomów? Uważam, że byłoby bardziej zrozumiałe, żeby w miejscach, gdzie prezentowane jest barwienie DNA za pomocą powszechnie znanego PI, napisać po prostu PI, albo DNA zamiast „chromatyna”.

Uwagi krytyczne, mniejszej wagi, niewymagające odpowiedzi:

- w artykule Nature Communications, na s.2 w zdaniu „partial male infertility and complete infertility in Tent5a KO (Tent5a^{-/-}) animals” brakuje „complete female”
- w artykule Nat. Com. Na stronie 5 przy omówieniu liczby potencjalnych transkryptów potencjalnych substratów podano liczbę „75” – według mnie powinno to być 65 (37 transkryptów skróconych u Tent5b/c DKO oraz 48 wydłużonych u Tent5b^{gfp/gfp}, przy 20 transkryptach wspólnych; to samo wynika z Venn diagramu)
- główne cele pracy w tekście wprowadzającym mogły zostać wyodrębnione w bardziej bezpośredni, punktowy sposób sygnalizujący w jakim stopniu cele te zostały zrealizowane w poszczególnych pracach.
- opis udziału doktoranta w opublikowanych zbiorowych pracach powinien zostać w bardziej wyraźny sposób odzwierciedlony w spisie treści, z tytułu „Manuscripts included in the PhD thesis and candidates contribution” nie wynika, że poniżej zostanie omówiony udział w pracach

Powyższe uwagi, nie zmieniają jednak pozytywnej oceny układu pracy oraz tego, że mgr Brouze jako pierwszy/ współ-pierwszy autor odegrał w przedstawionych badaniach kluczową rolę.

Podsumowanie:

Stwierdzam, że rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Celem pracy

było zbadanie nowych aspektów regulacji transkryptomu związanych z kontrolą ilości transkryptów poprzez poliadenylację związaną z polimerazami TENT5 oraz degradację RNA w trakcie spermatogenezy i oogenezy. Zaplanowano kompleksowe badania - unikalny zbiór skomplikowanych eksperymentów, które w satysfakcjonujący sposób zrealizowały postawiony cel. Uważam ponadto, że poprawne przeprowadzenie tych złożonych badań przez doktoranta świadczy o jego wysokim poziomie wiedzy ogólnej z dziedziny nauki biologiczne.

Podsumowując uważam, że praca doktorska mgr Michała Brouze spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. Zmianami). **Wnioskuje za tym z pełnym przekonaniem do Komisji Doktorskiej Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie o dopuszczenia mgr Michała Brouze do dalszych etapów przewodu doktorskiego i popieram wnioszek o nadanie mu stopnia naukowego doktora.**

Dodatkowo, z uwagi na wysoką wartość zaprezentowanych badań, potwierdzoną m.in. przez akceptację wyników w prestiżowym czasopiśmie Nature Communications, różnorodność i innowacyjność użytych technik, świadczących o niezależności naukowej i wysokim poziomie merytorycznym doktoranta **sugeruję oficjalne wyróżnienie pracy mgr Brouze.**

Dr hab. Michał Gdula