

Olsztyn, 30 grudnia 2024 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr. Michała Brouze zatytułowanej
„Analiza roli wybranych egzorybonukleaz i polimeraz poli(A) u myszy domowej”,
wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Andrzeja Dziembowskiego
w Laboratorium Biologii RNA
Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr. Michała Brouze poświęcona jest badaniom mechanizmów regulacji transkryptomu w rozwoju ssaków, ze szczególnym uwzględnieniem roli nowych enzymów w procesach poliadenylacji i degradacji RNA. Rozwój organizmów, zwłaszcza kręgowców, to dynamiczny i niezwykle złożony proces, który wymaga precyzyjnej regulacji ekspresji genów. Kluczowe znaczenie mają mechanizmy kontrolujące czasową i przestrzenną aktywację genów, w tym zmiany w poliadenylacji RNA oraz selektywna degradacja mRNA, umożliwiające różnicowanie komórek i tkanek. Złożoność tych procesów od lat stanowi przedmiot intensywnych badań, mających na celu lepsze zrozumienie mechanizmów regulacji RNA.

W swoich badaniach Pana mgr Brouze koncentruje się na dwóch kluczowych etapach rozwoju ssaków: gametogenezie oraz wczesnej embriogenezie u myszy (*Mus musculus*). Ze względu na istotną rolę procesów deadenylacji i poliadenylacji w regulacji genów podczas dojrzewania gamet, badania dotyczące gametodenezы skupiły się na nowej rodzinie polimeraz poli(A) – TENT5 (ang. *terminal nucleotidyltransferase 5*), w szczególności na TENT5B, TENT5C i TENT5D. Te białka zostały wcześniej zidentyfikowane jako niekanoniczne cytoplazmatyczne polimerazy poli(A). Chociaż mechanizmy poliadenylacji związane z białkami CPEB (ang. *cytoplasmic polyadenylation element binding proteins*) są stosunkowo dobrze poznane, dotychczasowe badania sugerowały istnienie alternatywnego, niezależnego od CPEB mechanizmu, w którym mogłyby uczestniczyć polimerazy poli(A) – TENT5. Z kolei badania dotyczące embriogenezy skupiły się na ostatniej katalitycznej podjednostce cytoplazmatycznego kompleksu egzozomu – egzorybonukleazie DIS3L (ang. *DIS3 like exosome 3'-5' exoribonuclease*). Selektowna degradacja mRNA jest kluczowym procesem w rozwoju zarodkowym ssaków, a dotychczasowe badania wskazały, że inne katalityczne podjednostki egzozomu, takie jak DIS3 i EXOSC10, są niezbędne dla prawidłowego przebiegu tego procesu.

Koncentrując się na gametogenezie oraz wczesnym rozwoju zarodków u ssaków, Doktorant podjął próbę rozwiązania ważnego poznawczo i oryginalnego problemu naukowego, dotyczącego fundamentalnych etapów rozwoju ssaków, które mają kluczową rolę w zachowaniu gatunku.

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA PRACY

Praca doktorska została napisana w języku angielskim i ma formę rozprawy składającej się z trzech wieloautorskich publikacji, również napisanych w języku angielskim. Jedna z publikacji została opublikowana w czasopiśmie *Nature Communications*, druga zaakceptowana do druku w *Scientific Data*, a trzecia znajduje się w formie preprintu na platformie *bioRxiv*. W dwóch z tych prac Pan mgr Brouze pełni rolę pierwszego autora.

Pierwsza część rozprawy, licząca 28 stron, obejmuje szczegółowe wprowadzenie do tematyki badań. Zawiera między innymi informacje o finansowaniu badań ze źródeł zewnętrznych (ERC, FNP, Horyzont 2020), streszczenia w języku polskim i angielskim, rozbudowany wstęp teoretyczny, omówienie wyników oraz bibliografię obejmującą 95 pozycji. Część ta kończy się listą publikacji wchodzących w skład rozprawy wraz z opisem wkładu Doktoranta w realizację badań i przygotowanie manuskryptów. Wprowadzenie można by udoskonalić, dodając wyraźnie sformułowane hipotezy badawcze oraz precyzyjne cele pracy – zarówno główne, jak i szczegółowe. Dodatkowo,

syntetyczna dyskusja kluczowych wyników mogłaby wzbogacić tę część o elementy analityczne, pokazując umiejętność syntezy i wyciągania wniosków przez Autora.

Drużga część rozprawy obejmuje trzy publikacje:

1. **Brouze M.**, Czarnocka-Cieciura A., Gewartowska O., Kusio-Kobiątka M., Jachacy K., Szpila M., Tarkowski B., Gruchota J., Krawczyk P., Mroczek S., Borsuk E., Dziembowski A. TENT5-mediated polyadenylation of mRNAs encoding secreted proteins is essential for gametogenesis in mice. *Nat Commun* 2024, 15, 5331.
2. Czarnocka-Cieciura A., **Brouze M.**, Gumińska N., Mroczek S., Gewartowska O., Krawczyk P., Dziembowski A. Comprehensive analysis of poly(A) tails in mouse testes and ovaries using Nanopore Direct RNA Sequencing. *Scientific Data*, accepted, in press (2024).
3. **Brouze M.**, Szpila M., Czerwińska A., Antczak W., Mroczek S., Kuliński T., Hojka-Osińska A., Cysewski D., Adamska D., Gruchota J., Borsuk E., Dziembowski A. DIS3L, cytoplasmic exosome catalytic subunit, is essential for development but not cell viability in mice. *bioRxiv* 2022.12.14.520403; doi: <https://doi.org/10.1101/2022.12.14.520403>.

Publikacje te tworzą spójny cykl tematyczny, wnosząc istotny wkład do badań nad regulacją transkryptomu w rozwoju ssaków. Stanowią one potwierdzenie wysokiego poziomu merytorycznego rozprawy oraz świadczą o znaczeniu tych badań w kontekście biologii molekularnej, a także rozwoju i rozrodu ssaków.

OCENA MERYTORYCZNA

Przedstawiony wstęp do rozprawy doktorskiej stanowi solidną podstawę teoretyczną oraz wprowadzenie do tematyki pracy, koncentrując się na dwóch kluczowych zagadnieniach: regulacji RNA w oogenezie (gametogenezie) i embriogenezie ssaków. Niefortunne wydaje się jednak zytułowanie sekcji „Oogenesis as a model for cytoplasmic polyadenylation”, ponieważ zawiera ona informacje dotyczące zarówno oogenezy, jak i spermatogenezy. Warto również zauważyć, że rola poliadenylacji w procesie spermatogenezy mogłaby zostać omówiona bardziej szczegółowo. Pomijając ten drobny mankament, wstęp merytoryczny do rozprawy jest dobrze osadzony w aktualnej literaturze naukowej i ukierunkowany na istotne pytania badawcze. Analiza tej części pracy pozwala stwierdzić, że Pan mgr Brouze wykazuje bardzo dobrą znajomość teoretyczną dotyczącą mechanizmów regulacji transkryptomu w rozwoju ssaków, ze szczególnym uwzględnieniem procesów poliadenylacji i degradacji RNA.

W krótkim rozdziale podsumowującym wyniki Doktorant przedstawia kluczowe osiągnięcia opisane w trzech publikacjach, z których każda wnosi istotny wkład w zrozumienie mechanizmów regulacji RNA w rozwoju ssaków. Dwa z załączonych artykułów zostały już poddane wnikliwej analizie i ocenie przez redakcję oraz niezależnych recenzentów, a fakt ich opublikowania lub akceptacji do druku w prestiżowych czasopismach naukowych potwierdza ich wysoką wartość merytoryczną.

Analiza poszczególnych publikacji dostarcza czytelnikowi wiele satysfakcji dzięki klarownemu sposobowi prezentacji i interpretacji wyników, wzbogacając naszą wiedzę o nowe informacje dotyczące procesów regulujących rozwój ssaków.

Publikacja 1. Autor wykazał, że polimerazy poli(A) - TENT5 są zaangażowane zarówno w proces spermatogenezy, jak i oogenezy. Analizując cztery krytyczne mutacje *Tent5* (*Tent5a*, *Tent5b*, *Tent5c*, *Tent5d* knock-out [KO]), opisał fenotypy związane z gametogenezą u myszy i zidentyfikował substraty dla TENT5 w jajnikach oraz jądrach.

Najważniejsze wyniki:

- TENT5B i TENT5C pełnią kluczowe role w oogenezie. Podwójna delecja tych genów prowadzi do niepłodności samic myszy, wynikającej z zatrzymania wzrostu pęcherzyków jajnikowych na etapie pęcherzyków antralnych. Próby przywrócenia tego procesu poprzez podanie gonadotropin (hCG, PMSG) okazały się nieskuteczne. Towarzyszy temu apoptoza widoczna zarówno w oocytach, jak i w otaczających je komórkach granulocy. Dodatkowo, samice z insercją TENT5B-GFP na C-końcu wykazują obniżoną płodność związaną z nieprawidłową organizacją wrzeciona podziałowego oraz odseparowaniem niektórych chromosomów. Okazało się również, że TENT5B i TENT5C poliadenylują grupę mRNA niezbędnych do oogenezy, takich jak GDF9 i ZP3. Zarówno brak, jak i nadmiar poliadenylacji zależnej od TENT5 prowadzi do zaburzeń oogenezy.

- TENT5C i TENT5D regulują różne etapy spermatogenezy. Delecja któregokolwiek z tych genów prowadzi do bezpłodności samców z charakterystycznymi fenotypami. U samców *Tent5c* KO obserwowano utratę główki plemnika lub DNA w nasieniu izolowanym z jądra. Z kolei u samców *Tent5d* KO jądra były wyraźnie mniejsze w porównaniu z myszami typu dzikiego (WT), a ich morfologia była zaburzona, co prowadziło do nieprawidłowości w syntezie steroidów, w tym obniżenia poziomu testosteronu. Wykazano również, że TENT5C i TENT5D

poliadenylują grupę mRNA charakterystyczną dla poszczególnych etapów spermatogenezy: TPPP2 w spermatydach *Tent5c* KO oraz RNASET2 w spermatocytach *Tent5d* KO.

- Analiza sekwencjonowania RNA wykazała, że TENT5 poliadenylują mRNA kodujące białka kierowane do retikulum endoplazmatycznego, co jest kluczowe w procesie gametogenezy. Obecność sekwencji sygnałowej dla retikulum endoplazmatycznego determinuje sposób regulacji zależnej od TENT5.

Publikacja dostarcza istotnych informacji na temat molekularnych mechanizmów regulujących gametogenezę u ssaków, podkreślając kluczową rolę poliadenylacji zależnej od TENT5 w regulacji ekspresji genów. Wyniki te potwierdzają istnienie alternatywnego mechanizmu poliadenylacji w procesie gametogenezy, co ma potencjalnie znaczące implikacje dla zrozumienia procesów rozwojowych oraz patologii związanych z nieprawidłową regulacją RNA. Ponadto, praca otwiera nowe kierunki badań nad funkcją poliadenylacji w rozwoju komórek rozrodczych i regulacji ich funkcji, wskazując na potrzebę dalszych analiz w tym obszarze.

Publikacja 2. W pracy przeprowadzono kompleksową analizę heterogenności ogonów poli(A) w mRNA w jądrach i jajnikach myszy, wykorzystując technologię Nanopore Direct RNA Sequencing. Analiza danych została przeprowadzona przy użyciu algorytmu Ninetails, opracowanego w Laboratorium Biologii RNA i opartego na sieciach neuronowych, który pozwolił na identyfikację specyficznych wzorców kompozycji nukleotydowej ogonów poli(A) w jądrze.

Najważniejsze wyniki:

- Zidentyfikowano znaczną nadreprezentację urydylacji w ogonach poli(A) w transkryptach pochodzących z jąder, szczególnie w pobliżu końca 3' transkryptu. Urydylacja była wyraźnie obecna w transkryptach kluczowych dla spermatogenezy, co wskazuje na jej istotną rolę w regulacji ekspresji genów związanych z rozwojem plemników.

- Precyzyjna analiza długości i kompozycji nukleotydowej ogonów poli(A) potwierdziła, że zarówno te cechy, jak i proces urydylacji odgrywają kluczową rolę w posttranskrypcyjnej regulacji stabilności i translacji mRNA na różnych etapach spermatogenezy. Wyniki te są zgodne z wcześniejszymi badaniami nad rolą enzymów TUT (ang. *terminal uridylyl transferases*; TUT4 i TUT7), które podkreśliły znaczenie 3'-urydylacji w stabilności RNA podczas spermatogenezy.

Wyniki przedstawione w publikacji dostarczają nowych informacji na temat mechanizmów regulacji transkryptów w procesie gametogenezy. Szczególną uwagę zwracają obserwacje dotyczące urydylacji w ogonach poli(A) w transkryptach związanych z rozwojem plemników, co wskazuje na ich kluczową rolę w regulacji ekspresji genów w tym procesie. Praca podkreśla znaczenie zrozumienia złożoności składu ogonów poli(A) oraz ich wpływu na procesy rozwojowe. Wskazuje również na potrzebę dalszych badań nad posttranskrypcyjną regulacją RNA, szczególnie w kontekście zdrowia reprodukcyjnego i potencjalnych mechanizmów patologicznych związanych z zaburzeniami spermatogenezy. Obserwacje te otwierają nowe kierunki badań, które mogą przyczynić się do pogłębienia wiedzy na temat molekularnych podstaw gametogenezy i rozwoju plemników.

Publikacja 3. Autor wykazał, że białko DIS3L, koprecypitujące ze wszystkimi dziesięcioma białkami egzozomu, jest niezbędne dla prawidłowego rozwoju zarodków. Konsekwencje letalnego fenotypu delecji DIS3L (*Dis3l* KO) zostały opisane na podstawie obserwacji rozwoju zarodków oraz szczegółowych badań molekularnych.

Najważniejsze wyniki:

- Embriogeneza myszy pozbawionych genu *Dis3l* kończy się śmiercią zarodków około dnia 6,5. Zarodki w okresie preimplantacyjnym nie wykazują widocznych zmian morfologicznych, jednak w okresie postimplantacyjnym ulegają degeneracji, mimo początkowo prawidłowej liczby komórek trofektodermy, epiblastu i endodermy.

- Zarodkowe komórki macierzyste wyprowadzone z embrionów *Dis3l* KO mogą być hodowane *in vitro*, jednak ich wydajność różnicowania jest obniżona, a ekspresja kluczowych genów rozwojowych, takich jak *Foxa2* i *Tbxt*, ulega znaczącym zmianom.

- Sekwencjonowanie RNA zarodkowych komórek macierzystych *Dis3l* KO wykazało nagromadzenie transkryptów, co wskazuje na defekty w regulacji transkryptomu. Mimo tego, globalny poziom syntezy białek w blastocystach z delecją DIS3L był znacząco zmniejszony, co sugeruje, że translacyjny stres jest głównym mechanizmem odpowiedzialnym za obniżenie wydajności syntezy białek.

Wyniki badania podkreślają kluczową rolę DIS3L w regulacji jakości RNA w rozwijających się zarodkach, ukazując zaangażowanie tej egzorybonukleazy w procesy regulacji translacji i jakości transkryptów w kluczowych etapach embriogenezy. Praca wykazała również różnice w regulacji RNA pomiędzy rozwijającym się organizmem a warunkami *in vitro*, co podkreśla odmiennosc mechanizmów regulacyjnych w różnych kontekstach biologicznych. Przełomowe wyniki tej publikacji wskazują na potencjalne implikacje kliniczne związane z nieprawidłowościami w funkcjonowaniu DIS3L. Jednocześnie otwierają nowe perspektywy badawcze, koncentrujących się na mechanizmach molekularnych związanych z translacyjnym stresem oraz możliwościach terapeutycznych w przypadku zaburzeń regulacji RNA w rozwoju zarodkowym.

PYTANIA I UWAGI

W przypadku złożonych i nietrywialnych prac naukowych, lektura nieuchronnie rodzi pytania i uwagi, które mogą stanowić cenny wkład w pogłębienie analiz oraz rozwój dyskusji na temat poruszanych zagadnień:

1. Uzyskane wyniki wskazują, że TENT5 poliadenyluje mRNA kodujące białka sekrecyjne podczas procesu gametogenezy u myszy. Czy istnieją inne grupy mRNA, które mogą być regulowane przez TENT5? Otwarte pozostaje także pytanie o potencjalne znaczenie tej grupy enzymów w innych układach biologicznych oraz o specyficzne preferencje substratowe w różnych typach tkanek.
2. Jakie mechanizmy molekularne mogą regulować aktywność TENT5 na różnych etapach gametogenezy? Czy możliwe jest istnienie specyficznych regulatorów funkcji tej grupy enzymów, których działanie będzie zależne od kontekstu biologicznego lub od określonego etapu tego procesu?
3. Publikacja 1 opisuje rolę TENT5 w poliadenylacji mRNA, jednak nie omawia szczegółowo mechanizmu interakcji tego enzymu z innymi białkami zaangażowanymi w regulację ekspresji genów. Czy enzymy TENT5 współdziałają z innymi polimerazami poli(A) w komórkach ssaków, a jeśli tak, to w jakim stopniu taka współpraca może wpływać na globalną regulację transkryptomu?
4. Nadreprezentacja urydlacji wydaje się charakterystyczna dla transkryptów pochodzących z jąder. Co powoduje tę specyficzność? Czy podobne procesy mogą zachodzić w jajnikach, lecz z uwagi na ich mniejszą intensywność pozostają niewykryte? Jakie mechanizmy molekularne stoją za urydlacją w transkryptach kluczowych dla spermatogenezy?
5. Czy translacyjny stres i zmniejszona synteza białek w zarodkach *Dis3l* KO wynikają głównie z akumulacji specyficznych transkryptów, czy raczej z ogólnego przeciążenia mechanizmów odpowiedzialnych za kontrolę jakości RNA?
6. Dlaczego zarodkowe komórki macierzyste pochodzące z zarodków *Dis3l* KO są zdolne do proliferacji *in vitro*, mimo że zarodki te nie rozwijają się prawidłowo w okresie postimplantacyjnym? Czy różnice te mogą wynikać z odmiennych mechanizmów regulacyjnych angażujących egzosom na etapie różnicowania i rozwoju poszczególnych listków zarodkowych?
7. Jak wyniki badań nad mysimi zarodkami odnoszą się do funkcji egzosomu w ludzkiej embriogenezie? Czy defekty DIS3L mogą tłumaczyć niektóre przypadki niepłodności ludzkiej? Czy istnieje możliwość zastosowania tych wyników w diagnostyce lub terapii klinicznej związanej z zaburzeniami reprodukcji?

W podsumowaniu stwierdzam, że przedłożona mi do oceny praca doktorska Pana mgr. Michała Brouze pt.: „Analiza roli wybranych egzorybonukleaz i polimeraz poli(A) u myszy domowej” (ang. *Analysis of the role of selected exoribonucleases and poly(A) polymerases in Mus musculus*) stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego i świadczy o szerokiej wiedzy teoretycznej Kandydata oraz jego umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Na podstawie przedstawionej analizy stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.). W związku z tym wnioskuję o dopuszczenie Autora rozprawy do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz nadanie mu stopnia naukowego doktora. Rozprawa wyróżnia się wysoką wartością naukową, która wynika z kompleksowego podejścia do badanego zagadnienia oraz zastosowania nowoczesnych i precyzyjnie dobranych metod badawczych. Znaczenie uzyskanych wyników oraz ich wkład w rozwój wiedzy w takich obszarach jak biologia molekularna oraz biologia rozwoju i rozrodu zasługują na szczególne uznanie, dlatego wnoszę o rozważenie możliwości wyróżnienia tej rozprawy.