

Dr hab. Maciej Cieśla, profesor instytutu
Międzynarodowy Instytut Mechanizmów i Maszyn Molekularnych
Polska Akademia Nauk
Marcina Flisa 6
PL-02-971 Warszawa
E: m.ciesla@imol.institute

Recenzja rozprawy doktorskiej pani Agnieszki Czarnockiej-Cieciury

1. Przedmiot recenzji

Praca doktorska pani Agnieszki Czarnockiej-Cieciury pod tytułem *The utilization of advanced RNA sequencing technologies to investigate post-transcriptional mechanisms involved in the regulation of gene expression*, została wykonana pod kierunkiem profesora Andrzeja Dziembowskiego (promotor) oraz doktora Pawła Krawczyka (promotor pomocniczy). Praca ta została złożona w ramach postępowania doktorskiego w dziedzinie nauk biologicznych i wykonana w Laboratorium Biologii RNA w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie.

Celem recenzowanej pracy doktorskiej było zbadanie mechanizmów cytoplazmatycznej deadenylacji i degradacji mRNA u drożdży oraz roli cytoplazmatycznych polimeraz poli(A) w regulacji stabilności transkryptów podczas gametogenezy u myszy. Wykorzystując technologię bezpośredniego sekwencjonowania RNA (DRS Oxford Nanopore) wraz z analizą obliczeniową, doktorantka scharakteryzowała dynamikę degradacji mRNA oraz szybkość deadenylacji w różnych warunkach fizjologicznych i stresowych. Dodatkowo, praca wskazuje na możliwe funkcjonalne znaczenie wzbogacenia ogonów poli(A) o niekanoniczne nukleotydy w kontekście dojrzewania komórek płciowych.

2. Ocena oryginalności i wkładu naukowego



Rozprawa podejmuje aktualny i istotny problem badawczy z zakresu biologii, dotyczący związku pomiędzy procesami post-transkrypcyjnej regulacji ekspresji genów, w szczególności dynamiki w równowadze adenylacja-deadenylacja oraz translacja-degradacja RNA. Autorka w pierwszej części rozprawy opisała aspekty metodologiczne bezpośredniego sekwencjonowania RNA metodą długich odczytów Oxford Nanopore. Następnie przeszła do implikacji możliwości zastosowania tego typu analiz do zrozumienia dynamiki powstawania ogonów poli(A) w czasie dojrzewania RNA oraz jego cyklu życiowego obejmującego re-adenylację w obrębie cytoplazmy. Kończącą część wstępu obejmuje opis zależności pomiędzy deadenylacją przez komplementarne kompleksy Pan2-Pan3 oraz Ccr4-Not a degradacją mRNA. Dodatkowo w tej sekcji zawarty jest zwięzły opis tkankowo specyficznej kontroli długości ogonów poli(A) oraz regulacji tej cechy transkryptów w odpowiedzi na szczególne reakcje stresowe dla komórki. Dzięki temu wstępowi, Autorka kreśli ramy umożliwiające przejście do zasadniczej części rozprawy doktorskiej, którą stanowią trzy artykuły oryginalne w których pani Agnieszka Czarnocka-Cieciura odegrała wiodącą rolę (pierwsze lub drugie autorstwo). Wyniki mają charakter oryginalny i stanowią istotny wkład w rozwój wiedzy w obszarze biologii molekularnej, ich główne implikacje postaram się omówić w sposób krytyczny poniżej.

Praca #1 Czarnocka-Cieciura, A., Poznański, J., Turtola, M., Tomecki, R., Krawczyk, P. S., Mroczek, S., Orzeł, W., Saha, U., Jensen, T. H., Dziembowski, A., & Tudek, A. (2024). Modeling of mRNA deadenylation rates reveal a complex relationship between mRNA deadenylation and decay. *EMBO Journal*, 43(24), 6525–6554.

Ogony poli(A), występujące na końcach 3' niemal wszystkich eukariotycznych mRNA, są kluczowe dla stabilności i translacji tych cząsteczek. Usuwanie ogona poli(A), czyli deadenylacja, stanowi ważny mechanizm regulujący ekspresję genów. Pierwsza praca dotyczyła bardzo wnikliwej analizy zależności pomiędzy deadenylacją a degradacją RNA, z uwzględnieniem specyficzności wobec określonych grup transkryptów, wpływu usunięcia czapeczki m⁷-guanozynowej, a także roli białek z rodziny Pab (poly(A) binding). Dodatkowo opisany jest model matematyczny (w dwóch odmianach, umożliwiających bądź to oznaczenie czasów życia oraz progresji deadenylacji dla dużych grup danych, bądź to zmodyfikowany, aplikowalny dla mniejszych oznaczeń biologicznych) zbudowany w celu zrozumienia procesywności deadenylacji.

W pracy zastosowano układ doskonale wybranych mutantów drożdżowych *Sacharomyces cerevisiae*, o zablokowanej możliwości eksportu nowopowstających transkryptów z jądra komórkowego (zahamowanie ścieżki Mex67), a także pozbawionych białek związanych z



metabolizmem RNA. Analiza mutantów białek Pab1, Dcp2 oraz Xrn1 pozwoliła na charakterystykę relacji między deadenylacją a pozbawieniem czapeczki mRNA, a także na wytłumaczenie roli białka Pab1. Od strony metodologicznej w pracy zaprezentowano oryginalny model badania dynamiki deadenylacji oparty na danych uzyskanych metodą bezpośredniego sekwencjonowania RNA.

W moim odczuciu na szczególne zaznaczenie zasługuje fakt użycia nowatorskiej metody (zarówno technologicznie jak i analitycznie) do weryfikacji hipotezy co do której poprzednie badania nie dawały możliwości rzeczywistej i bezpośredniej oceny. W szczególności doktorantka wraz ze współpracownikami wykazała korelacje między szybkością deadenylacji, tempem degradacji i okresem półtrwania transkryptów. Dodatkowo określiła cechy transkryptów (ich poziom ekspresji czy też długość ogonów poli(A)) wpływające na szybkość deadenylacji. Intrygującą część manuskryptu stanowi oznaczenie w warunkach stresu komórkowego (stres cieplny i stymulacja tiolutyną), tempa deadenylacji i degradacji. Autorka postuluje, że zmiany w tempie deadenylacji umożliwiają szybszą adaptację komórki poprzez remodelowanie transkryptomu.

Praca #2 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. (2024). TENT5-mediated polyadenylation of mRNAs encoding secreted proteins is essential for gametogenesis in mice. *Nature Communications*, 15, 5331.

W pracy tej skupiono się na regulacji gametogenezy poprzez cytoplazmatyczne polimerazy poli(A) z rodziny TENT5, co do których grupa zgromadziła poprzednio obserwacje w układzie osteogenezy czy też odpowiedzi odpornościowej. Autorzy dokonali analizy rozwoju gamet w liniach myszy pozbawionych ekspresji (*knock-out* – KO) oraz z wprowadzonymi kopiami z metkami białkowymi/polipeptydowymi (*knock-in* – KI) poszczególnych genów TENT5 (Tent5a, Tent5b, Tent5c, Tent5d, podwójny KO Tent5b/c oraz znakowane GFP Tent5c/d KI). Stwierdzono, że u samic brak Tent5a, podwójny KO Tent5b/c oraz mutacje Tent5b-GFP powodują nieplodność, podczas gdy u samców podobny efekt obserwuje się u zwierząt Tent5c i Tent5d KO.

Analizy poszczególnych etapów gametogenezy w myszach transgenicznym pozwoliły precyzyjnie zidentyfikować momenty, w których pojawiają się defekty zależne od poszczególnych polimeraz lub ich kombinacji. Szczególnie interesujące wydają się w tym kontekście dwie obserwacje: 1. wysoka specyficzność fenotypów, zarówno na poziomie organizmu jak i komórkowym w poszczególnych wariantach genetycznych; oraz 2. wpływ



zróznicowanych poziomów/aktywności TENT5 na poliadenylację w obrębie określonych mRNA, bez towarzyszącego globalnego efektu na długość ogonów poli(A). W kontekście pierwszej obserwacji interesujące może być potencjalne istnienie wariantów lub mutacji TENT5 w populacji, w szczególności w odniesieniu do płodności. Jak chodzi o wyjaśnienie specyficzności substratowej, praca wskazuje na rolę lokalizacji subkomórkowej i obecności sekwencji lokalizującej w obrębie siateczki śródplazmatycznej.

Podsumowując, w pracy tej doktorantka wykazała, że poliadenylacja mRNA przez polimerazy z rodziny TENT5 jest niezbędna do prawidłowego przebiegu gametogenezy u myszy, szczególnie w kontekście mRNA kodujących białka wydzielnicze. W moim odczuciu jest to doskonały przykład pracy łączącej badania odnośnie fundamentalnych procesów molekularnych (tutaj: niekanoniczna poliadenylacji cytoplazmatycznej), z głębokim zrozumieniem implikacji fenotypowych (zaburzenia gametogenezy).

Praca#3 Czarnocka-Cieciura, A., Brouze, M., Gumińska, N., Mroczek, S., Gewartowska, O., Krawczyk, P. S., & Dziembowski, A. (2025). Comprehensive analysis of poly(A) tails in mouse testes and ovaries using Nanopore Direct RNA Sequencing. *Scientific Data*, 12(1), 43.

Celem publikacji było stworzenie repozytorium danych dotyczących mutantów polimeraz poli(A) z rodziny TENT5 w gametogenezie, bazując na bezpośrednim sekwencjonowaniu RNA metodą długich odczytów. Dodatkowo, za cel praca stawia stworzenie metod analitycznych pozwalających na wiarygodną analizę tego typu danych w odniesieniu do homogennych sekwencji o repetytywnym składzie, jakimi są np. ogony poli(A). W tym celu użyto wyników z pracy#2, pochodzących z próbek w trakcie oogenezy i spermatogenezy kiedy to diploidalne komórki przechodzą podział mejotyczny, prowadząc do powstania haploidalnych gamet. Proces ten wymaga kompleksowej przebudowy transkryptomu, w której kluczową rolę odgrywają mechanizmy posttranskrypcyjnej regulacji genów na różnych etapach dojrzewania. Uzyskane dane pozwalają na lepsze zrozumienie złożoności transkryptomu w czasie tych dynamicznych przejść komórkowych.

Analizie poddano dane z sekwencjonowania Oxford Nanopore pochodzące z różnych linii myszy mutantów Tent5b, Tent5c oraz Tent5d, a także odpowiednich kontroli, pozyskane w ramach wcześniejszych badań z pracy#2. Surowe sygnały z bezpośredniego sekwencjonowania RNA zostały przetworzone za pomocą programu *Ninetails*, który umożliwia wykrywanie nukleotydów nie-adeninowych w ogonach poli(A). Co ciekawe, stwierdzono, że mRNA izolowane z jajników i jąder zawiera znacznie wyższy odsetek nukleotydów



niekanonicznych w porównaniu z innymi tkankami myszy. Ze względu na charakter pracy (artykuł metodologiczny), nie pokuszono się o wyjaśnienie implikacji biologicznych tego faktu.

Za siłę pracy należy uznać uzupełnienie danych z bezpośredniego sekwencjonowania za pomocą wyników z sekwencjonowania metodą krótkich odczytów Illumina z sortowanych populacji komórek jąder myszy typu dzikiego i mutantów *Tent5c*. Analiza składu ogonów poli(A) wykazała obecność urydyn na końcach tych sekwencji, co wiąże się z procesem urydytacji mRNA, znanym jako istotny mechanizm post-transkrypcyjnej regulacji kluczowy dla prawidłowego rozwoju komórek rozrodczych.

Końcowo, analiza ekspresji wykazała, że transkrypty z urydylowanymi ogonami poli(A) są silnie ekspresjonowane w spermatydach, a ich poziom zmienia się w trakcie dojrzewania plemników. Wyniki te podkreślają dynamiczną rolę urydytacji w regulacji stabilności i funkcji mRNA podczas gametogenezy i wpisują się w badania nad nietypowymi modyfikacjami cząsteczek RNA w specyficznych procesach tkankowych.

3. Ocena poprawności metodologicznej

Zgodnie z opisem zawartym w rozprawie, pani Agnieszka Czarnocka-Cieciura skupiała się w swojej pracy na analizie bioinformatycznej i obliczeniowej wyników uzyskiwanych metodą bezpośredniego sekwencjonowania RNA w systemie Oxford Nanopore. Opis metod zawarty w publikacjach jest szczegółowy, a ostatnia z zawartych w dysertacji prac zawiera dostęp oraz gotową do użycia metodę (*Ninetails*) oznaczenia szczególnie trudnych do analizy sekwencji repetytywnych zawierających homopolimery składające się z wielu powtórzeń w obrębie ogonów poli(A). Na podkreślenie zasługuje fakt, że tego typu analizy, zarówno pod względem metodologicznym jak i obliczeniowym stanowią młodą, a równocześnie niezwykle obiecującą gałąź w badaniach mających na celu zrozumienie złożoności transkryptomów. Badania macierzystego zespołu, w tym również te przedstawione w recenzowanej pracy doktorskiej, znajdują się więc na pierwszej linii frontu w badaniach mających na celu lepsze zrozumienie zależności pomiędzy budową a funkcją molekularną RNA.

4. Struktura, język i forma pracy

Praca została napisana w języku angielskim, w sposób klarowny i komunikatywny. Ze względu na fakt, że trzon pracy stanowią trzy prace opublikowane w wysmienitych periodykach (co w znacznej mierze upraszcza również obowiązki recenzenta), pozostałe części rozprawy pozostają zwięzłe, mając na celu bądź to wprowadzenie do właściwej części rozprawy, bądź



to podsumowanie najważniejszych wątków w części dotyczącej dyskusji. Reasumując, praca jest przygotowana bardzo starannie i klarownie pod względem edycyjnym.

5. Osiągnięcia publikacyjne

W skład rozprawy doktorskiej wchodzi 3 artykuły opublikowane w czasopiśmie *EMBO Journal*, *Nature Communications* oraz *Scientific Data*, co stanowi w znacznej mierze rękojmię jakości pracy oraz jej istotności dla środowiska naukowego zajmującego się biologią kwasów rybonukleinowych. Poza wzmiankowanymi trzema artykułami zawartymi w rozprawie doktorantka opublikowała 3 inne artykuły naukowe.

6. Uwagi szczegółowe

Przedstawiona praca doktorska stanowi spójne, inspirujące intelektualnie oraz silne metodologicznie opracowanie. Fakt publikacji w wiodących czasopiśmie dotyczących biologii molekularnej i komórkowej zawęża pole dla recenzenta odnośnie uwag krytycznych. Byłbym równocześnie ciekaw myśli doktorantki odnośnie niniejszych punktów, które proponuję omówić w czasie dyskusji po przedstawieniu wyników rozprawy doktorskiej.

- praca odnośnie relacji pomiędzy tempem deadenyacji oraz degradacji wskazuje na różną prędkość deadenyacji dla transkryptów różniących się poziomem ekspresji. Interesujący jest fakt krótszej długości ogonów poli(A) oraz ich wolniejsza deadenyacji dla transkryptów o wyższym poziomie ekspresji. Jakże mogą być determinanty oraz implikacje molekularne tej obserwacji?
- jakie sensory są odpowiedzialne za wykrywanie długości ogonów poli(A) poniżej 20 nukleotydów oraz za ich szybką degradację;
- czy stworzony model matematyczny ma potencjał do wykrywania procesów komórkowych zależnych od zmian w prędkości deadenyacji-degradacji. Jakże procesy chorobotwórcze mają potencjał do bycia regulowanymi na tym poziomie;
- jak można wytłumaczyć zmiany w płodności myszy pomiędzy genotypami Tent5b KO, Tent5c KO oraz Tent5b/c dKO, z przywróceniem płodności u samców dKO w porównaniu do Tent5c KO i odwrotnym fenotypem wśród samic;
- rola cytoplazmatycznych polimeraz poli(A) wydaje się w szczególności dotyczyć mRNA kodujących wydzielane białka. Jaki może być powód biologiczny oraz czy doktorantka spodziewa się fenotypów komórkowych związanych z zaburzeniem tej osi przekazu sygnału w tkankach o wysokim tempie sekrecji;



- Doktorantka nie odnalazła szczególnych motywów w 3' UTR ani sekwencji kodującej mRNA będących potencjalnymi celami TENT5. Na czym opiera się zatem specyficzność tych polimeraz? Autorzy sugerują, że brak jest znanych czynników regulujących, czy rozważali alternatywne mechanizmy rozpoznawania, np. przez interakcje z białkami ER lub strukturami RNA?

- jakie są odczucia doktorantki odnośnie możliwości modyfikacji nukleozydów wchodzących w skład ogonów poli(A). Jaka może być rola grupowania się reszt urydylowych na końcu ogonów poli(A).

Punkty te są jedynie wyjściem do dyskusji naukowej w czasie obrony pracy doktorskiej.

7. Ocena końcowa i wniosek

Podsumowując, rozprawa doktorska autorstwa Pani Agnieszki Czarnockiej-Cieciury przedstawia oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, została przygotowana na wysokim poziomie merytorycznym i metodologicznym, oraz spełnia wymagania określone w art. 187 ust. 1 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668, z późn. zm.).

W związku z powyższym wnoszę o dopuszczenie rozprawy doktorskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego. Równocześnie ze względu na jakość pracy oraz jej istotny wkład w zrozumienie regulacji post-transkrypcyjnej zarówno na poziomie molekularnym jak i fizjologicznym, wnoszę o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.

Z poważaniem,

Maciej Cieśla

Warszawa, 21 czerwca 2025