

Prof. dr hab. Jerzy Ciesiolka
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
ul. Noskowskiego 12/14
61-704 Poznań
e-mail: jerzy.ciesiolka@ibch.poznan.pl

Poznań, dnia 9 września 2020 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Macieja Jerzego Śmiałka pt.: A global identification of mRNAs regulated by PUM1 and PUM2 and their protein cofactors, in the model of human seminoma (TCam-2)

Rozprawa doktorska mgr Macieja Śmiałka wykonana została pod kierunkiem prof. dr hab. Jadwigi Jaruzelskiej w Zakładzie Funkcji Kwasów Nukleinowych w Instytucie Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu. Promotorem pomocniczym rozprawy był dr Marcin Piotr Sajek. Od szeregu lat grupa badawcza kierowana przez Prof. J. Jaruzelską prowadzi z dużym powodzeniem badania mechanizmów regulacji ekspresji genów w komórkach płciowych. Badania koncentrują się szczególnie na potranskrypcyjnych mechanizmach regulacyjnych angażujących białka posiadające domeny wiązania z RNA, ich białkowe kofaktory, mikroRNA oraz nieulegające translacji regiony 3' wybranych mRNA. Recenzowana rozprawa doktorska wpisuje się w tą szczególnie ważną dla rozrodu człowieka problematykę badawczą.

Przedstawiona do recenzji rozprawa oparta jest na zestawie czterech tematycznie powiązanych publikacji, których współautorem jest mgr Maciej Śmiałek. Rozprawa przygotowana została w języku angielskim w formie zbliżonej do tradycyjnych prac doktorskich. Podzielona została na następujące, zasadnicze części: *Wprowadzenie* (16 stron), *Hipoteza i cele pracy* oraz *System modelowy* (łącznie 4 strony), *Wyniki i dyskusja* (135 stron łącznie z kopiami czterech artykułów) oraz *Spis publikacji* (około 130 pozycji) odrębny od literatury cytowanej w czterech artykułach będących trzonem rozprawy. Rozprawa zawiera także *Streszczenie* w wersji polsko- i angielsko-języcznej, *Wykaz stosowanych skrótów* oraz *Graficzne streszczenie pracy*.

We *Wprowadzeniu* do rozprawy mgr Maciej Śmiałek skupił się na mechanizmach potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genu przy udziale regionów nie ulegających translacji obecnych na końcu 3' cząsteczek mRNA oraz białek oddziałujących z tym regionem. W szczególności, opisał rodzinę białek PUM, potranskrypcyjnych regulatorów ekspresji genów zaangażowanych między innymi w morfogenezę oraz rozwój komórek gametogenicznych różnych organizmów. Białka te zawierają domenę PUF wiążącą RNA, rozpoznającą 8-nukleotydowy motyw obecny zazwyczaj w obrębie 3'UTR niektórych mRNA. Opisany został sposób oddziaływania białek PUM z aparatem translacyjnym oraz mechanizmy ich udziału w represji lub aktywacji ekspresji, a także lokalizacji specyficznych mRNA. W ostatnich podrozdziałach tej części rozprawy Doktorant scharakteryzował rolę białek Pumilio u zwierząt w szeregu procesach komórkowych oraz podsumował informacje literaturowe na temat podobieństw i różnic w funkcjonowaniu paralogów PUM. Wprowadzenie stanowi doskonale uzupełnienie czterech oryginalnych publikacji będących trzonem rozprawy. Sądzę, że dzięki bardzo kompetentnemu sposobie przedstawienia tematu opartemu na najnowszej literaturze przedmiotu, *Wprowadzenie* stanowi bardzo dobry materiał do przygotowania publikacji przeglądowej.

Na kolejnych kilku stronach w rozdziałach - *Hipoteza i cele pracy* oraz *System modelowy*, mgr Maciej Śmiałek wskazuje, że wspólnym celem czterech artykułów wchodzących w skład rozprawy było poznanie znaczenia paralogów PUM1 i PUM2 w rozrodzie człowieka, z zastosowaniem komórek TCam-2 pochodzących z nasieniaka. Komórki te reprezentują gametogeniczne komórki męskie we wczesnym etapie rozwoju prenatalnego i zdaniem Autora rozprawy jest to jedyna rosnąca *in vitro* linia ludzkich komórek rozrodczych.

Zasadnicza część rozprawy – *Wyniki i dyskusja* podzielona została na trzy części, odpowiadające trzem zagadnieniom, którym poświęcone były opublikowane artykuły. Każda z części poprzedzona została krótkim omówieniem najważniejszych wyników. Ponadto, w każdej części jasno sprecyzowany został udział mgr Macieja Śmiałka w wykonaniu części doświadczalnej prac oraz w przygotowaniu artykułów do publikacji. Informacje te uzupełniają oświadczenia pozostałych współautorów, dotyczące ich udziału w przeprowadzonych badaniach.

Część pierwsza rozdziału *Wyniki i dyskusja* dotyczy wyników opisanych w dwóch artykułach:

1. Kinesin KIF18A is a novel PUM regulated target promoting mitotic progression and survival of human male germ cell line. Autorzy: Śmialek M.J., Kuczynska B., Ilasslan E., Janecki D.M., Sajek M.P., Kusz-Zamelczyk K. and Jaruzelska J. Artykuł opublikowano w: *Journal of Cell Science*, 2020, 133, jcs240966.
2. SPIN1 is proto-oncogene and SPIN3 is a tumor suppressor in human seminoma. Autorzy: Janecki D.M., Sajek M., Śmialek M.J., Kotecki M., Ginter-Matuszewska B., Kuczynska B., Spik A., Kolanowski T., Kitazawa R., Kurpisz M. and Jaruzelska J. Artykuł opublikowano w: *Oncotarget*, 2018, 9, 32466-32477.

Celem prac opisanych w artykułach było zbadanie udziału paralogów PUM1 i PUM2 w mechanizmach proliferacji, apoptozy i progresji cyklu komórkowego, w kontekście dwóch wybranych docelowych mRNA wiążących białka PUM. Pierwszy z nich koduje kinezynę KIF18A, która jest ważnym białkiem regulującym cykl komórkowy i apoptozę w komórkach rozrodczych zwierząt. Potranskrypcyjna regulacja KIF18A nie była wcześniej szeroko badana. Okazało się, że białka PUM1 i PUM2 powodowały represję KIF18A. Wykazano natomiast, że KIF18A ma przeciwny wpływ na proliferację, apoptozę i progresję cyklu komórkowego, niż białka PUM. Autorzy sugerują, że mechanizm represji przy udziale białek PUM może być jednym z mechanizmów wpływających na poziom KIF18A w kontrolowaniu proliferacji, cyklu komórkowego i apoptozy komórek linii TCam-2. W drugim artykule opisano funkcjonalne znaczenie i regulację przez białka PUM docelowych mRNA kodujących białka SPIN1 i SPIN3. mRNA zidentyfikowano jako potencjalne cele białek PUM drogą analiz bioinformatycznych, gdyż zawierają one zdefiniowane motywy sekwencyjne wiążące te białka w obrębie regionów 3'UTR. Otrzymane wyniki sugerowały, że SPIN1 jest proto-onkogenem, podczas gdy SPIN3 supresorem nowotworowym w komórkach TCam-2. Korzystając z systemu reporterowego lucyferazy z konstruktami zawierającymi pełne lub skrócone regiony 3'UTR mRNA SPIN1 lub SPIN3, stwierdzono, że PUM1 i PUM2 powodują represję białek SPIN i że w represji tej pośredniczyły regiony 3'UTR ich mRNA. Obserwacje te potwierdzono przy użyciu RT-qPCR, badając poziom mRNA SPIN1 i SPIN3 po nadekspresji i wyciszeniu białek PUM. W konkluzji, Autorzy obu artykułów wykazali, że białka

PUM1 i PUM2 regulują proliferację, cykl komórkowy i apoptozę komórek TCam-2 drogą represji ekspresji białek SPIN1, SPIN3 i KIF18A.

Udział mgr Macieja Śmiałka w pracach opisanych w pierwszym artykule, określony przez Doktoranta i zgodny z oświadczeniami współautorów publikacji, polegał na: badaniu poziomu mRNA i białka KIF18A po nadekspresji PUM1 i PUM2 oraz po ich wyciszeniu przy użyciu technik RT-qPCR oraz western blot, analizie cyklu komórkowego i apoptozy metodą cytometrii przepływowej po wyciszeniu ekspresji PUM1, PUM2 i KIF18A za pomocą siRNA, wykonaniu eksperymentów RNA-koimmunoprecypitacji, analizie za pomocą RT-qPCR poziomu KIF18A mRNA po wyłączeniu czynników apoptotycznych przez siRNA. W pracach opisanych w drugim artykule Doktorant wykonywał: analizę morfologii jąder komórkowych, wyciszenie ekspresji białek PUM1 i PUM2 za pomocą siRNA oraz wykonywał analizy typu RT-qPCR, eksperymenty ko-immunoprecypitacji, analizy typu western blot po wyciszeniu białek PUM1 i PUM2 oraz eksperymentach immunoprecypitacji.

Wymaga podkreślenia, że pierwsza z dwóch wymienionych powyżej publikacji była współfinansowana z grantu ETIUDA pozyskanego przez mgr Macieja Śmiałka, a jest on nie tylko jej pierwszym autorem ale również jednym z dwóch autorów do korespondencji, obok Promotorki Jego rozprawy doktorskiej.

Druga część rozdziału *Wyniki i dyskusja* przedstawia prace opisane w artykule:

3. PUM1 and PUM2 exhibit different modes of regulation for SIAH1 that involve cooperativity with NANOS paralogues. Autorzy: Sajek M., Janecki D.M., Smialek M.J., Ginter-Matuszewska B., Spik A., Oczkowski S., Ilaslan E., Kusz-Zamelczyk K., Kotecki M., Blazewicz J. and Jaruzelska J. Artykuł opublikowano w: *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2019, 76, 147-161.

Celem prac opisanych w tym artykule było zbadanie mechanizmu represji przez białka PUM, w powiązaniu z wybranymi białkami kofaktorowymi z rodziny białek NANOS. Jako cząsteczkę docelową dla białek PUM wybrano ludzki mRNA kodujący ligazę ubikwityny SIAH1, o roli supresora nowotworowego, który został zidentyfikowany we wcześniejszych badaniach przesiewowych. Co ciekawe, stosując test opóźnienia migracji w żelu wykazano różnice w obrazie tworzonych kompleksów RNP charakterystycznych dla domen PUF1 i PUF2 wiążących się z fragmentami 3'UTR mRNA kodującego białko SIAH1. Wynik ten był dość nieoczekiwany i może wskazywać na rozbieżne preferencje domen PUF1 i PUF2 wobec sekwencji nukleotydowych flankujących wiązane motywy w mRNA. W jaki sposób można by, zdaniem Autora, zweryfikować sformułowaną hipotezę? Jakie doświadczenia zaplanowałby, aby wyjaśnić funkcjonalne znaczenie tych regionów w mRNA? W powyższym artykule wykazano także, wykorzystując system reporterowy lucyferazy z konstrukcjami zawierającymi SIAH1 3'UTR oraz komórki HEK293FT, że PUM1 w przeciwieństwie do PUM2 reguluje ekspresję białka reporterowego, niezależnie od obecności motywów wiążących białka PUM zlokalizowanych w SIAH1 3'UTR. Wykazano ponadto, że NANOS3 w przeciwieństwie do NANOS2 oddziałuje bezpośrednio z fragmentami SIAH1 3'UTR, niezależnie od obecności domen PUF1 lub PUF2. Jest to pierwsza obserwacja wskazująca, że białko Nanos bezpośrednio wiąże RNA. Jak wykazały testy reporterowe, poszczególne paralogi NANOS wywierały zróżnicowany wpływ na represję SIAH1. Mianowicie, represja SIAH1 była najsilniejsza w przypadku kombinacji NANOS3/PUM2. Natomiast mutacja NANOS1 zidentyfikowana wcześniej u nieplodnych mężczyzn, a także mutacja NANOS3 u nieplodnych kobiet, znacząco zmieniła represję SIAH1 przez PUM1 i PUM2. Wskazuje to na bardzo istotne znaczenie badanych mechanizmów dla rozrodu człowieka.

W trakcie powyższych badań Doktorant wykonał większość eksperymentów ko-immunoprecypitacji typu RNA-białko i białko-białko, wykonał większość analiz typu western blot po nadekspresji białek PUM1, PUM2, NANOS1, NANOS2 i NANOS3, a także wykonywał analizy RT-qPCR.

Trzecia część rozdziału *Wyniki i dyskusja* przedstawia prace opisane w artykule:

4. Characterization of RNP Networks of PUM1 and PUM2 Post-Transcriptional Regulators in TCam-2 Cells, a Human Male Germ Cell Model. Autorzy: Smialek M.J., Ilaslan E., Sajek M., Swiercz A., Janecki D.M., Kusz-Zamelczyk K., Wozniak T., Kotecki M., Handschuh L., Figlerowicz M. and Jaruzelska J. Artykuł opublikowano w: MDPI Cells. 2020, 9(4), pii: E984.

W artykule tym starano się ustalić, czy białka PUM1 i PUM2 regulują różne cele, a zatem mogą odgrywać rozbieżne role w ludzkich komórkach płciowych. Podejrzewano, że kofaktor białkowy, taki jak NANOS, może również odgrywać rolę w selekcji docelowych RNA do regulacji kontrolowanej przez białka PUM. Przeprowadzono zatem badanie przesiewowe pod kątem białek wiążących PUM1 i PUM2, stosując linię komórkową TCam-2. Zastosowano immunoprecypitację RNA wobec tych białek, a otrzymane pule RNA zsekwencjonowano. Otrzymane wyniki zestawiono z wynikami różnicowej ekspresji genów uzyskanymi po wyciszeniu PUM1 lub PUM2. Częsteczki RNA, które zostały zidentyfikowane w eksperymencie immunoprecypitacji i których poziom został zmieniony po wyciszeniu białka PUM za pomocą siRNA, uznano za regulowane przez PUM. Stwierdzono, że spośród mRNA regulowanych przez PUM około 90% było regulowanych tylko przez jedno białko PUM1 lub PUM2, podczas gdy tylko 10% stanowiły częsteczki regulowane przez obydwa białka. Ponadto, stosując globalne profilowanie białek oparte na spektrometrii mas, zidentyfikowano białka oddziałujące z PUM, w sposób zależny bądź niezależny od RNA. Wśród 47 oddziałujących białek zależnych od RNA tylko 7 było wspólnych, podczas gdy wśród 64 białek oddziałujących niezależnie od RNA 15 było wspólnych dla białek PUM1/PUM2. Okazało się przy tym, że większość białek oddziałujących z PUM bierze udział w obróbce częstecek RNA. Jako ostatni krok analizy, przeprowadzono analizę kombinatoryczną otrzymanych wyników. Analiza ta ujawniła, że białka PUM1 i PUM2 tworzą w większości różne i tylko nieznacznie nakładające się sieci regulacyjne kompleksów RNP (regulony RNA), co wskazuje na rozbieżne role tych białek w reprodukcji człowieka i w procesie nowotworzenia.

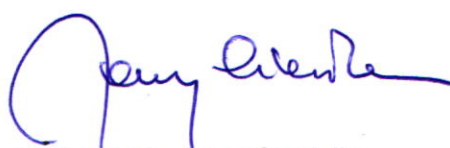
Udział mgr Macieja Śmiałka w otrzymaniu powyższych wyników polegał m.in. na wykonaniu następujących prac: eksperymentów ko-immunoprecypitacji RNA, wszystkich analiz typu western-blot oraz RT-qPCR, przeprowadzeniu analiz bioinformatycznych dla identyfikacji częstecek docelowych dla PUM1 i PUM2, eksperymentów ko-immunoprecypitacji białko-białko i przygotowaniu próbki do spektrometrii mas, analiz statystycznych wszystkich wyników otrzymanych technikami western-blot oraz RT-qPCR.

Ważne, że podobnie jak w przypadku pierwszego artykułu Doktorant jest nie tylko pierwszym autorem powyższej publikacji ale również jednym z dwóch autorów do korespondencji, a prace współfinansowane były z pozyskanego przez niego grantu ETIUDA.

Problematyka badawcza podjęta przez mgr Macieja Śmiałka w recenzowanej rozprawie jest bardzo ważna, a otrzymane wyniki stanowią znaczący wkład dla poznania znaczenia białek PUM dla procesów istotnych dla płodności, apoptozy, podziałów oraz cyklu komórkowego. Dużą wagę naukową wyników potwierdza wysoka ranga czasopism, w których zostały opublikowane (5-letni współczynnik oddziaływania czasopism w zakresie 4,9 – 6,8: trzy artykuły – 140 i jeden – 100 pkt MNiSW). W dwóch artykułach Doktorant jest

pierwszym autorem, a w dwóch występuje na miejscu trzecim. Specjalnego podkreślenia wymaga, że w dwóch pierwszo-autorskich artykułach jest równocześnie jednym z dwóch autorów do korespondencji. Świadczy to, że w ich powstanie wniósł więcej niż jest to zazwyczaj oczekiwane od badacza na tym etapie kariery naukowej. Rozprawa doktorska przygotowana została w sposób bardzo przejrzysty, z wyraźnym określeniem znaczącego udziału Doktoranta w przygotowaniu każdej z czterech współautorskich publikacji. Biorąc powyższe pod uwagę, sądzę z pełnym przekonaniem, że rozprawa doktorska mgr Macieja Śmiałka zasługuje na wyróżnienie.

Reasumując, przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską mgr Macieja Śmiałka oceniam bardzo wysoko i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Genetyki Człowieka PAN o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnoszę o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.



Prof. dr hab. Jerzy Ciesiołka