



Izabela Makałowska, prof. dr hab.
Instytut Biologii i Ewolucji Człowieka
Wydział Biologii
Uniwersytet im A. Mickiewicza w Poznaniu

Poznań, 8.09.2020 r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ PANA MACIEJA JERZEGO ŚMIAŁKA „A GLOBAL IDENTIFICATION OF MRNA REGULATED BY PUM1 AND PUM2 AND THEIR PROTEIN COFACTORS, IN THE MODEL OF HUMAN SEMINOMA (TCAM-2)“

Rozprawa doktorska przedstawiona przez Pana Macieja Śmiałka została wykonana w Instytucie Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Jadwigi Jaruzelskiej oraz dr Marcina Sajka pełniącego funkcję promotora pomocniczego. Rozprawa doktorska obejmuje zbiór czterech spójnych tematycznie publikacji naukowych opublikowanych w latach 2018-2020. Zawarte w rozprawie prace są pracami eksperymentalnymi i ukazały się w renomowanych czasopismach naukowych. Wszystkie artykuły są publikacjami wieloautorскими. W dwóch z nich, opublikowanych w *Journal of Cell Science* i *MDPI Cells*, Doktorant jest pierwszym autorem. W dwóch pozostałych publikacjach, które ukazały się w czasopismach *Oncotarget* i *Cellular and Molecular Life Sciences*, mgr Śmiałek jest trzecim autorem. Załączone oświadczenia współautorów oraz pozycja Doktoranta jako pierwszego lub trzeciego autora pozwalają na stwierdzenie, że wkład Doktoranta był znaczący w przypadku wszystkich publikacji. Do publikacji, oprócz streszczeń w języku polskim i angielskim, dołączone jest szesnastostronicowe wprowadzenie opisujące stan wiedzy w zakresie tematu pracy oraz krótkie omówienie hipotez badawczych i modelu badawczego. Publikacje dotyczące poszczególnych zadań badawczych poprzedzone są dodatkowo skrótowym wprowadzeniem zawierającym wyniki, dyskusję i konkluzje.

Temat rozprawy doktorskiej dotyczy białek PUM1 i PUM2 zaangażowanych w morfogenezę i rozwój komórek gametogenicznych co wpisuje się w realizowane z dużym powodzeniem w zespole Pani Promotor badania dotyczące czynników związanych z procesem spermatogenezy. Podjęta tematyka jest istotna nie tylko dlatego, że dotyczy często występującego problemu niepłodności u mężczyzn, ale także z tego względu, że niepłodność u mężczyzn wiąże się bardzo często z

nowotworami jąder wywodzącymi się z komórek rozrodczych.

Badania przeprowadzone w ramach projektu doktorskiego obejmują trzy zadania. Pierwsze z nich dotyczy wpływu białek PUM1 i PUM2 na transkrypty genów *KIF18A* oraz *SPIN1* i *SPIN3*, a co za tym idzie wpływu na procesy, w których kodowane przez te geny białka biorą udział: apoptozę, podziały komórkowe i cykl komórkowy. Wyniki tych badań opublikowane zostały w dwóch artykułach: *Kinesin KIF18 is a novel PUM-regulated target promoting mitotic progression and survival of a human male germ cell line*, który ukazał się w czasopiśmie *Journal of Cell Science* oraz *SPIN1 is a proto-oncogene and SPIN3 is a tumor suppressor in human seminoma*, który został opublikowany w czasopiśmie *Oncotarget*. W obu pracach zastosowano podobną strategię badawczą wykorzystując takie metody jak immunoprecypitacja RNA, RT-qPCR, wyciszanie za pomocą siRNA, testy lucyferazowe, testy MTS i cytometrię przepływową. Dzięki logicznie zaprojektowanym i konsekwentnie przeprowadzonym eksperymentom Doktorant wykazał w nieskomplikowany (w jak najbardziej pozytywnym znaczeniu), a jednocześnie bardzo elegancki sposób, że poziom badanych transkryptów jest modulowany przez białka PUM. Dodatkowo wykazano, że *KIF18A* jest istotne dla procesów apoptozy, proliferacji i progresji cyklu komórkowego, a jego represja za pośrednictwem PUM1 i PUM2 może być powiązana ze zjawiskami promującymi nowotwory. Przeprowadzone badania pozwoliły także na ustalenie, że *SPIN1* jest najprawdopodobniej proto-onkogenem, a *SPIN3* supresorem nowotworowym, a białka PUM poprzez regulację *SPIN1* i *SPIN3* wpływają na procesy związane ze spermatogenezą. Odnośnie tej części badań mam w zasadzie tylko jedno zastrzeżenie. W pracy dotyczącej białek *SPIN1* i *SPIN2* we wstępie czytamy: „*Spin1* is largely homologous to Y-linked *Ssty* spermiogenesis-specific transcripts”. Otóż homologia jest cechą zero-jedynkową i nie może być stopniowana. Dane geny, białka czy narządy albo są homologiczne, czyli mają wspólne pochodzenie, albo też nie. Nie mogą być bardziej lub mniej homologiczne.

Drugie zadanie realizowane w ramach pracy doktorskiej miało na celu zbadanie współdziałania białek PUM i NANOS w regulacji poziomu mRNA oraz zakresu nakładania się funkcji pomiędzy białkami PUM oraz pomiędzy białkami NANOS. Wyniki tych badań opublikowane zostały w artykule *PUM1 and PUM2 exhibit different modes of regulation for *SIAH1* that involve cooperativity with NANOS paralogues*, który ukazał się w czasopiśmie *Cellular and Molecular Life Sciences*. W badaniach oparto się na takim samym modelu jaki został wykorzystany w badaniach współdziałania PUM-NANOS u muszki z rodzaju *Drosophila* koncentrując się na docelowym dla PUM transkrypcie genu *SIAH1*. Podobnie jak w przypadku wcześniej wymienionych prac, badania przeprowadzone zostały bardzo systematycznie wykorzystując wielorakie, uzupełniające się podejścia

eksperymentalne co sprawia, że praca jest bardzo solidna, a wnioski mocno wsparte wynikami. Mgr Śmiałek zaangażowany był w prace przeprowadzane na różnych etapach badań wykonując analizy RT-qPCR, przeprowadzając eksperymenty związane z immunoprecypitacją i co-immunoprecypitacją czy też wykonując eksperymenty Western blot. Tym samym Doktorant ma swój udział w niemal wszystkich uzyskanych wynikach. W rezultacie przeprowadzonych badań udało się po raz pierwszy wykazać, że PUM1 i PUM2 nie nakładają się, a przynajmniej nie całkowicie, w swoim działaniu na specyficzne docelowe mRNA, a efekt współdziałania białek PUM i białek NANOS jest uzależniony od ich kombinacji.

Przeprowadzone eksperymenty poprzedzone były analizami bioinformatycznymi i tutaj zaintrygowała mnie jedna rzecz, a mianowicie to, że w celu identyfikacji transkryptów zawierających motyw NRE (z ang. NANOS Response Elements) wykorzystano bazę sekwencji nukleotydowych zdeponowanych w Banku Genów oraz bazę sekwencji EST. Wydawałoby się, że genom człowieka jest już bardzo dobrze adnotowany i wystarczyłoby wykorzystać sekwencje wszystkich alternatywnych transkryptów znanych genów. Zaciekało mnie czy, a jeśli tak to w jakim stopniu, wykorzystanie sekwencji EST pozwoliło na zwiększeniu puli zidentyfikowanych mRNA zawierających poszukiwane motywy. W pracy nie znalazłam także informacji, ile w ogóle takich mRNA udało się znaleźć poza SIAH1.

Czwarta z publikacji stanowiących rozprawę doktorską pt. *Characterization of RNP Networks of PUM1 and PUM2 Post-Transcriptional Regulators in TCam-2 Cells, a Human Male Germ Cell Model* ukazała się w czasopiśmie *MPDI Cells* i w odróżnieniu od wcześniejszych, przedstawione w niej badania opierają się w większości na eksperymentach wysokoprzepustowych i analizach bioinformatycznych. Praca ta poświęcona jest charakteryzacji regulatorowych sieci RNP powiązanych z PUM1 i PUM2 w komórkach TCam-2 służących jako model męskich komórek rozrodczych. Doktorant jest tutaj pierwszym autorem i wykonał większość analiz bioinformatycznych i statystycznych jak i dużą część eksperymentów. Kombinacja różnych metod wysokoprzepustowych, analiz bioinformatycznych i eksperymentów potwierdzających wybrane wyniki pozwoliły na prawdziwie kompleksowe zbadanie powiązań pomiędzy PUM, ich sekwencjami docelowymi oraz innymi białkami oraz określenie funkcjonalnych różnic i powiązań pomiędzy PUM1 i PUM2. Udało się także skonstruować regulon PUM-RNA. Zróżnicowane i systematycznie przeprowadzane eksperymenty oraz rygorystyczne filtrowanie wyników analiz bioinformatycznych doprowadziło do wyselekcjonowania regulowanych przez PUM i istotnych w procesach spermatogenezy mRNA. Pomimo silnego wsparcia wynikami analiz, funkcjonalne powiązanie pomiędzy wyselekcjonowanymi mRNA, a PUM1 i PUM2 poddane zostało

eksperymentalnemu potwierdzeniu. Takie potwierdzenie jest bardzo istotne, gdyż w przypadku eksperymentów wysokoprzepustowych niemożliwym jest całkowite uniknięcie wyników fałszywie pozytywnych. Właśnie z tym elementem związane jest moje pytanie. Spośród 18 mRNA wyselekcjonowanych jako regulowane przez PUM1 i PUM2 na podstawie danych z eksperymentu RIP-seq i różnicy poziomów ekspresji pomiędzy normalnymi komórkami jądra z komórkami TCam-2, udało się potwierdzić 15. Natomiast spośród 9 mRNA wyselekcjonowanych również na podstawie danych z eksperymentu RIP-seq ale w połączeniu z danymi pochodzącymi z innych prac wskazujących na powiązanie mRNA z niepłodnością, potwierdzonych jako regulowane przez PUM zostało 7 mRNA. Chciałabym zapytać jakie mogły być powody braku potwierdzenia eksperymentalnego. Czy wynika to z problemów technicznych i eksperymentów po prostu nie udało się przeprowadzić czy też wyniki nie potwierdzały tego, że dane mRNA jest regulowane przez PUM?

Podsumowując badania przeprowadzone przez Doktoranta warto podkreślić widoczną we wszystkich pracach solidność. W każdym z wyznaczonych zadań nie zadowolono się jednym czy dwoma udanymi eksperymentami, potwierdzającymi, przynajmniej w jakimś stopniu, wysunięte hipotezy. Zawsze przeprowadzony był cały cykl eksperymentów badających zadany problem pod nieco innym kątem i w inny, ale nawzajem uzupełniający się, sposób. Solidność badań prowadzonych przez Doktoranta i znaczenie wyników potwierdzone są rangą czasopism, w których ukazały się publikacje wchodzące w skład rozprawy. Wszystkie czasopisma znajdują się na liście JCR, a ich współczynniki oddziaływania (IF) wynoszą od 4,573 do 6,496. Co również istotne podejmowane przez Doktoranta zadania badawcze były nowatorskie i dotyczyły nie eksplorowanych wcześniej zagadnień związanych z pozornie szeroko zbadanymi już białkami PUM. Dostarczyły one wielu nowych, ciekawych i co ważne bardzo wiarygodnych wyników.

Pod względem technicznym rozprawa została przygotowana poprawnie choć Doktorant nie ustrzegł się kilku niedociągnięć.

- W spisie skrótów zabrakło wyjaśnienia skrótu NRE. Nie jest to dużym problemem, gdyż skrót jest wyjaśniony w samej publikacji i przytaczam to bardziej z obowiązku recenzenta niż z powodu związanego z tym jakiegoś problemu
- W czwartej z zamieszczonych w rozprawie publikacji, na stronie 131 rozprawy, odniesienia do rysunku 1G wskazują na lewy panel i prawy panel, podczas gdy powinno być „górny panel i dolny panel” ponieważ wykresy znajdują się jeden pod drugim a nie obok siebie

- Brakuje części suplementów dotyczących wyżej już wspomnianej publikacji; spośród 12 tabel w rozprawie zamieszczone są jedynie tabele 1 i 2, w przypadku pozostałych tabel umieszczone są jedynie ich opisy. Być może wynika to z obszerności tabel, ale powinno to być wyjaśnione, opisy bez tabel są mało informatywne.

Podsumowując, mogę z pełnym przekonaniem stwierdzić, że przedstawiona rozprawa doktorska jest nie tylko bardzo dobrze przygotowana, ale zawiera także mnóstwo nowych i bardzo ciekawych wyników dotyczących białek PUM1 i PUM2 oraz regulowanych przez nie mRNA. Wspomniane powyżej drobne niedociągnięcia w żadnym stopniu nie wpływają na jakość rozprawy i nie umniejszają jej naukowego znaczenia. Rozprawa doktorska mgr Macieja Śmiałka spełnia wszystkie ustawowe i zwyczajowe wymogi. W związku z tym zwracam się do Rady Instytutu Genetyki Człowieka PAN o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu. Ponadto, biorąc pod uwagę trudną tematykę, nowatorstwo pracy oraz znaczenie naukowe przedstawionych wyników wnioskuję o wyróżnienie rozprawy zgodnie z przyjętymi zasadami.

Z poważaniem,

