

**RECENZJA**

rozprawy doktorskiej mgr inż. Cezarego Odrzygóźdźa pod tytułem:

'Identyfikacja oraz wstępna charakterystyka białek odpowiedzialnych za międzykomórkowy transport kwasów nukleinowych u *Schmidtea mediterranea*'**Tematyka badań i cele rozprawy**

Pan mgr inż. Cezary Odrzygóźdź przygotował rozprawę doktorską jako autorskie opracowanie wyników eksperymentalnych wykonanych w ramach uczestnictwa w projekcie pt.: Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie „NanoBioTech”, realizowanym wspólnie przez trzy jednostki: Politechnikę Poznańską, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu oraz Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk, a projekt jest współfinansowany przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego, Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020. Praca została przygotowana pod kierownictwem, prof. dr hab. Marka Figlerowicza (promotor) oraz we współpracy z Panią dr Natalia Koralewską (promotor pomocniczy) i wpisują się w tematykę naukową metabolizmu małych niekodujących RNA, realizowaną z powodzeniem w Zakładzie Biologii Molekularnej i Systemowej, IChB-PAN. Praca skierowana jest na poznanie zjawiska regulacji ekspresji genów pod wpływem egzogenego dsRNA, które może być pobierane ze środowiska, i wywierać ogólnoustrojowy wpływ na poziom ekspresji genów, zjawiska zwanego środowiskową interferencją RNA - eRNAi (*environmental RNA interference*). Sam proces interferencji RNA, był jak i jest aktywnie eksplorowany przez wiele grup badawczych na całym świecie, czego rezultatem jest poznanie szlaków metabolicznych związanych z regulacją ekspresji informacji genetycznej na bazie małych nie kodujących RNA; co ważne, wiedza ta stała się podstawą do opracowania techniki, tzw. 'reverse genetics', która obecnie święci triumfy w naukach eksperymentalnych, w celu badania funkcji wielu białek na drodze wyłączenia ekspresji genów kodujących badane białka. Co więcej, RNAi a przede wszystkim eRNAi, znalazło już zastosowanie w biotechnologii jako nowa lub alternatywna broń do zwalczania szkodników roślin uprawnych, które nabyły odporność na klasyczne insektycydy. Pomimo już dobrze ugruntowanej pozycji RNAi w świecie naukowym, to jednak mechanizmy pobierania jak i transportu dsRNA ze środowiska zewnętrznego do komórki i jednocześnie jego dystrybucji nie zostały dobrze poznane, oraz znaczenie biologiczne eRNAi także pozostaje strefą mało poznaną. Doktorant swoimi działaniami wypełnia tę mało eksplorowaną niszę naukową, podejmując temat analizy funkcjonalnej białek receptorowym w transporcie i dystrybucji dsRNA; Opracował On dedykowany model badawczy na bazie organizmu *Schmidtea mediterranea* - wyptawka. Działania Doktorant można zaklasyfikować do prac w zakresie 'high-risk/high-gain research', w których to Doktorant wychodząc od założonej tezy, opracowuje wstępne dane na bazie prac *in silico* (analizy filogenetyczne wraz z klasyczną analizą modelowania struktury białka na bazie sekwencji aminokwasowej) typując obiekty badawcze – białka z rodziny SID – transportery/receptory dla dsRNA, a następnie przeprowadza ich weryfikację metodami



eksperymentalnymi, z powodzeniem wykorzystując szereg technik w zakresie biologii molekularnej, wykazując się doskonale opanowanym warsztatem badawczym.

Ocena pracy

Przedstawione do oceny opracowanie zostało przygotowane w klasycznym układzie dla prac doktorskich jako autorska praca Pana mgr inż. Cezarego Odrzygóźdźcia; praca zawiera wstęp, cele, materiały i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenie, literatura, załączniki i spis rysunków. Praca została przygotowana starannie, a forma prezentacji danych nie budzi zastrzeżeń, spełniając standardy naukowe dla opracowań tego typu.

Opracowanie otwiera wstęp, formujący obraz tematyki, w której Doktorant jest zakotwiczone. Autor skupia swoją uwagę na zjawisku interferencji RNA - RNAi wskazując, że jest to jeden z mechanizmów w regulacji ekspresji informacji genetycznej, wpływając na stabilność mRNA czy na regulację wykorzystania mRNA w translacji, a tym samym podkreśla fakt, że mechanizmy regulujące stan proteomu w komórce posiadają wielopoziomowy wymiar. Co ważne, Autor zwraca uwagę na fakt, iż zjawisko RNAi z jednej strony wywiera bezpośrednie oddziaływanie na metabolizm pojedynczej komórki, ale sygnał na bazie dsRNA i proces RNAi może posiadać charakter systemowy, tj. może rozprzestrzeniać się układowo, zjawisko zwane jako środowiskowe RNAi, eRNAi (*environmental RNA interference*). Autor wskazał, że rola biologiczna środowiskowego RNAi nie została wyjaśniona sugerując, że może ono mieć charakter horyzontalnego transferu informacji, w szczególności u niższych eukariontów, które za pośrednictwem dsRNA jako molekuł sygnałowych mogą adaptować się do zmian środowiskowych. Jednym z zasadniczych zagadnień jakie porusza Autor, w związku ze środowiskowym RNAi, jest mechanizm pobierania i transportu dsRNA przez organizmy wielokomórkowe. Doktorant wskazuje, że w proces ten zaangażowane jest grupa białek SID, a przede wszystkim białka SID-1 i SID-2. Białka te mają charakter białek transmembranowych, z tym, że SID-1 działa jako niespecyficzny transporter RNA zaś SID-2 może działać jako receptor dla dsRNA, który indukuje pobór dsRNA na drodze endocytozy. Doktorant podkreśla, że pomimo wielu lat badań, nie zaproponowano modelu opisującego pobór i dystrybucji dsRNA w obrębie wielokomórkowych organizmów; ponadto wskazał On, że obecnie jedyny model badawczy opiera się na organizmie *C. elegans*. Podsumowując, Pan mgr inż. Cezary Odrzygóźdź przedstawił obecny stan wiedzy na temat zjawiska eRNAi, wskazując na aspekty dobrze poznane, ale co ważne uwypuklając wyzwania naukowe jakie stoją przed środowiskiem naukowym, aby lepiej poznać funkcję egzogenego dsRNA w procesie regulacji metabolizmu komórki eukariotycznej. Autor posiada gruntowną wiedzę, pozwalającą na krytyczne podejście do problemu, co jest kluczowe dla kreatywnej pracy naukowej i podejmowania ambitnych zamierzeń naukowych.

Zasadniczym celem pracy było 'wkroczenie' na mało poznane terytorium związane z tematyką transportu i dystrybucji dsRNA w obrębie organizmu wielokomórkowego. Aby osiągnąć ten cel, Doktorant opracował system badawczy z na bazie wyplawka jako organizmu modelowego, a drogą do osiągnięcia celu była identyfikacja i charakterystyka funkcjonalna białek, które są zaangażowane w pobieranie ze środowiska dsRNA i międzykomórkowy transport kwasów nukleinowych. Podjęte działania można podzielić na dwa zadania: pierwszy to działania



z zakresu prac koncepcyjnych, na bazie których Doktorant zidentyfikował cele analityczne – geny/białka, które mogą być zaangażowane w transport/dystrybucję dsRNA, druga część to eksperymentalna walidacja zidentyfikowanych celów. W pierwszym zadaniu Autor dokonał identyfikacji celów, tj. genów kodujących białka SID w genomie/transkryptomie wyplawka wykorzystując klasyczne metody oparte na algorytmie BLAST, a przede wszystkim tBLASTn, z wzorcami SID-1 i SID-2 pochodzącymi z *C. elegans*, wykorzystując dedykowaną bazę danych 'PlaneMine' zawierającą genomowe/transkryptomowe dane wyplawka; Autor nie wspomina o proteomie wyplawka – czy takowy jest dostępny? Doktorant, zidentyfikował pięć transkryptów wykazujących podobieństwo do referencyjnego genu SID-1, zaś nie zidentyfikowano homologa dla genu SID-2; nasuwa się pytanie, czy zastosowana jedna metoda analityczna – tBLASTn – była wystarczająca, a tym samym, czy brak genu/białka SID-2 u wyplawka, może wynikać z ograniczeń analitycznych; czy wykorzystano inne metody analityczne, aby zweryfikować obecność czy brak zidentyfikowanych genów/transkryptów (np. algorytm FASTA, czy inne). W dalszej części Doktorant dokonał wyboru trzech form/homologów dla białka SID-1 wyplawka, a następnie zweryfikował On ich obecność eksperymentalnie metodą RT-PCR, potwierdzając jednoznacznie obecność zidentyfikowanych transkryptów w transkryptomie wyplawka. W dalszej części Doktorant przeprowadził analizę filogenetyczną na bazie 23 sekwencji z 14 gatunków; myślę, że byłoby ciekawe wykonać analizę biorąc pod uwagę szeroki zakres organizmów z różnych grup systematycznych, co mogłoby wskazać drogę ewolucyjną genu/białka SID. W dalszej kolejności, Doktorant skupił swoją uwagę na walidacji i jednocześnie określeniu poziomu ekspresji genów kodujących białka Smed-SIDT1-3 na poziomie tkankowym, komórkowym i subkomórkowym na modelu wyplawka. W tym miejscu chciałbym się zatrzymać na drobnej kwestii semantycznej, tj.: Autor pisze „Kluczowe z perspektywy zrozumienia funkcji genów jest określenie tkankowo-specyficznych wzorów ich ekspresji.” - cel podania informacji jest zasadny, ale zastanawiam się, jak Autor rozumie informację ...funkcji genów... ; nawiązując do słów naszego Wieszcza, Juliusza Słowackiego: „Chodzi mi o to, aby język giętki, powiedział wszystko, co pomyśli głowa...” – czy gen, poza kodowaniem informacji, może posiadać jeszcze inną funkcję. Skupiając się na merytoryce, muszę przyznać, że Doktorant obrał dwu-wektorową drogę analityczną, aby dokonać walidacji zidentyfikowanych transkryptów dla białek Smed-SIDT1-3. I tak, z jednej strony przeprowadził On profilowanie bioinformatyczne na bazie dostępnych danych transkryptomowych z poszczególnych tkanek i izolowanych komórek wyplawka, a co najważniejsze przeprowadził eksperymentalną walidację lokalizacji tkankowej poszczególnych transkryptów. Wykorzystał On technikę WISH (*whole-mount in situ hybridization*), co pozwoliło zdefiniować obecność poszczególnych transkryptów w całym ciele wyplawka. W konsekwencji, Doktorant zbudował spójną mapę lokalizacji transkryptów dla białek Smed-SIDT1-3, wykorzystując dostępne bazy danych jak i własne analizy; prace te jednoznacznie wskazały, że geny dla badanych białek efektywnie ulegają ekspresji, a co ciekawe wzór jest charakterystyczny dla każdego transkryptu, podkreślając potencjalne zróżnicowanie w funkcji białek w obrębie ciała wyplawka. W tym miejscu nasuwa się pytanie o identyfikację białek Smed-SIDT1-3; czy takowa identyfikacja była rozpatrywana; należy podkreślić, że obecność transkryptu dla danego białka nie jest równoznaczna z obecnością białka, a tym



samym pozostaje kwestią do rozwiązania, czy badane transkrypty podlegają aktywnej translacji; czy Doktorant rozpatrywał prace na poziomie białka, np. analizy immuno-detekcji itp. Zakres prac badawczych doktoranta nie tylko ograniczył się do analiz na poziomie biologii tkanek, ale także skupił swoją uwagę na hipotetycznej dystrybucji tych białek w komórce; wykorzystując ponownie narzędzia bioinformatyczne - DeepLock wskazał, że białka te posiadają potencjał do lokalizacji w membranie komórkowej; fakt ten, podkreśla ich trans-membranowy charakter, a tym samym wskazuje, że mogą one posiadać rolę białek receptorowych. Końcowy etap analiz *in silico* to analiza topologii oraz opracowanie modelu strukturalnego; prace wskazały, że białka te posiadają domeny trans-membranowe, a modele strukturalne pozwoliły na określenie pozycji poszczególnych domen w badanych białkach; Doktorant do opracowania modeli strukturalnych wykorzystał narzędzie zwane trRosetta, ale myślę że zasadne by było wykorzystać szereg narzędzie, z 'AlphaFold' na czele, czy 'ESM Metagenomic Atlas', co zapewniło by większą wiarygodność analiz *in silico*. Podsumowując, pierwsza część opracowania, to szeroko zakrojone meta-analizy wsparte walidacją eksperymentalną, na bazie których Doktorant z dużą dozą prawdopodobieństwa zidentyfikował białka należące do grupy białek zaangażowanych w transport dsRNA.

Należy przyznać, że prace *in silico* (dodatkowo zweryfikowane eksperymentalnie) stały się 'preludium' do zainicjowania, zasadniczego zadania, tj. analiz funkcjonalnych białek Smed-SIDT1-3 na bazie podejścia 'reverse genetics'. Doktorant, oparł analizy funkcjonalne na bazie wyciszenia genów kodujących białka Smed-SIDT1-3, wykorzystując dwa model badawcze: wypławek, jako zasadniczy obiekt oraz komórki embrionalne *D. melanogaster*, które nie posiadają białka homologicznego SIDT1. Pierwszy krok, jak że ważny, to opracowanie modelu eksperymentalnego, z właściwymi kontrolami, i walidacją efektywności wyciszenia poszczególnych genów. Zadanie to zostało zrealizowane bardzo dobrze, Doktorant opracował i wykonał wyciszenie genów Smed-SIDT1-3, ocenił kluczowe parametry jak: efektywność, trwałość efektu, behavior wypławka, reakcję na stres czy współzależności poziomu poszczególnych transkryptów w stosunku do wyciszanego genu. Jako tzw. 'readout' w analizie funkcjonalnej Doktorant wykorzystał dobrze poznany fenotyp, tj. wyciszenie ekspresji β -kateniny prowadzące do zaburzenia polarności w ciele wypławka, tzw. dwugłowy fenotyp. W swoim postępowaniu założył On, że wyciszenie ekspresji genów Smed-SIDT1-3, może skutkować zaburzeniem transportu dsRNA ze światła jelita wypławka, karmionego dsRNA w celu wyciszenia ekspresji β -kateniny, i w konsekwencji, nie powinno powodować dwugłowego fenotypu. Należy podkreślić, że podejście eksperymentalne Doktoranta to doskonały przykład działań z zakresu tzw. 'hypothesis-driven research', w których to wyniki z analiz meta-genomiczne posłużyły do przygotowania warsztatu analitycznego w celu walidacji postawionej hipotezy badawczej. W rezultacie, Doktorant, wykazał, że wypławki z obniżoną ekspresją poszczególnych genów, Smed-SIDT #1, #2 i #3, nie wykazywały obniżonej ekspresji genu dla β -kateniny (potwierdzone metodą RT-PCR), co także miało odzwierciedlenie w fenotypie, tj. fenotyp dziki dominował; nasuwa się pytanie w związku z tym, czy zaburzenie w poziomie ekspresji genów Smed-SIDT1-3, a tym samym 'braku' określonych białek, może obniżyć dystrybucję czy pobór dsRNA? Należy wskazać



także, że efekt nie jest równo cenny, wyciszenie ekspresji genu #1 wywołuje najsilniejszy efekt; jak Doktorant interpretuje ten wynik, czy można to korelować z lokalizacją transkryptów/białek w ciele wyławkowa i jednocześnie przypisać wstępne funkcje? Czy raczej jest związane zależnościami ekspresji między poszczególnymi genami – jak Doktorant wskazał na przykładzie wyciszenia ekspresji genów Smed-SIDT1-3 na rycinie IV-22. Jako ostatni etap w ocenie funkcjonalnej białek Smed-SIDT1-3 Autor opracowania przeprowadził charakterystykę badanych białek w układzie modelowych, na bazie komórek S2 z *D. melanogaster*, komórek które z powodzeniem zostały wykorzystane do charakterystyki białka homologicznego Ce-SID-1. Doktorant przygotował komórki S2 transfekowane wektorami kodującymi poszczególne geny Smed-SIDT1-3, co pozwoliło na syntezę białek Smed-SIDT1-3 z etykietą V5 (obecność białek potwierdzono metodą western blotting (WB)) – zastanawia mnie kontrola K+, która pokazuje ekspresję białka kontrolnego EGFP-V5, jak przypuszczam jest to fluorescencyjne białko zielone; masa molekularna tego białko to 27 kDa – a sygnał w kontroli koresponduje z masą około 200 kDa – jak Doktorant interpretuje ten wynik – Rys. IV-32, K+). Tak przygotowane komórki zostały eksponowane na siRNA znakowane fluoresceiną, a efektywność poboru RNA została oceniona z wykorzystaniem cystometrii przepływowej; otrzymane wyniki wskazały, że siRNA zostało pobrane do komórek, które prowadziły ekspresję jednego z badanych białek Smed-SIDT1-3, z efektywnością (po 60 min ekspozycji) około 40% niezależnie od badanego białka. Jak Doktorant interpretuje osiągniętą wydajność, wynoszącą około 40% - czy jest to podyktowane niską transfekcją komórek S2 wektorami kodującymi białka Smed-SIDT1-3 – czy niską wydajnością transportu RNA do komórek S2; czy Doktorant rozpatrywał użycie kontroli, na przykład już wcześniej badanego białka Ce-SID-1?

Podsumowując, przeprowadzone prace badawcze przez Pana mgr inż. Cezarego Odrzygóźdźdia, to spójne działania naukowe, które poprzez działania koncepcyjne oparte o analizy *in silico* wyznaczyły logiczny wektor poznawczymi. Mając solidne podstawy, oraz opracowany model analityczny, Doktorant przeprowadził analizy funkcjonalne wskazując, że zidentyfikowane geny/transkrypty mogą kodować białka o charakterze receptorów związanych z transportem dsRNA. Wszystkie działania naukowe, to wymagające pod względem technicznym prace eksperymentalne, które zostały wykonane przez Doktoranta bardzo dobrze, z zachowaniem stosownych standardów eksperymentalnych. Końcowym efektem działań Doktoranta jest opracowany i zweryfikowany funkcjonalnie model eksperymentalny, który może posłużyć do dalszych prac naukowych w kierunku poznania roli środowiskowej interferencji RNA – eRNAi. W niniejszej ocenie nie można pominąć końcowej części opracowania, tj. Dyskusji; informacja podana przez Doktoranta jest jasna, spójna, widać swobodę w syntezie danych eksperymentalnych z aktualnym stanem wiedzy; ponownie wracając do naszego Wieszcza, i cytując fragment z Jego utworu, tekst opracowania można podsumować: „Strofa być winna taktem, nie wędzidłem” i tekst Doktorant posiada takowy ‘*takt*’ naukowy.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny praca doktorska to autorskie opracowanie naukowe Pana mgr inż. Cezarego Odrzygóźdźdia, które spełnia standardy stawiane opracowaniom tego typu.



Stwierdzam, że Doktorant na drodze meta-analiz w połączeniu z badaniami funkcjonalnymi opracował nowatorski model badawczy, kładąc podwaliny pod prace badawcze w kierunku wyjaśnienia zjawiska środowiskowej interferencji RNA – eRNAi. Doktorant wykazał się profesjonalnym warsztatem naukowy w zakresie analiz *in silico* jak i na polu analiz eksperymentalnych w zakresie biologii molekularnej, co czyni Go osobą o wysokich kwalifikacjach. Podsumowując, rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz.1789 ze zm.) w związku z art.179 ust.1 i 2 ustawy z 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz.1669) i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu o dopuszczenie Pana mgr inż. Cezarego Odrzygóźdźcia, do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lublin 23.02.2023

Prof. dr hab. Marek Tchórzewski

