



prof. dr hab. Mikołaj Olejniczak

Pracownia Biochemii RNA

10 lutego 2023, Poznań

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Cezarego Odrzygóźdza

pt. „Identyfikacja oraz wstępna charakterystyka białek odpowiedzialnych za międzykomórkowy transport kwasów nukleinowych u *Schmidtea mediterranea*”

Praca doktorska Pana mgr inż. Cezarego Odrzygóźdza została wykonana pod opieką promotora Pana prof. dr hab. Marka Figlerowicza oraz promotora pomocniczego Pani dr Natalii Koralewskiej w Zakładzie Biologii Molekularnej i Systemowej Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Temat rozprawy doktorskiej dotyczy niezwykle ważnego i ciekawego zagadnienia jakim są mechanizmy regulacji procesów regeneracyjnych u zwierząt. Modelem badawczym w pracy jest wyplawek *Schmidtea mediterranea*, który jest zdolny do bardzo efektywnej regeneracji dzięki stałej obecności w organizmie populacji pluripotentnych komórek macierzystych oraz multipotentnych neoblastów.

Jednym z ważnych narzędzi biologii molekularnej, które mogą być zastosowane do badania procesu regeneracji jest selektywne wyciszenie genów za pomocą mechanizmu RNAi. Działanie tego mechanizmu jest zależne od wprowadzenia dsRNA do badanego organizmu. Aby dobrze zrozumieć w jaki sposób to narzędzie może być stosowane w badaniach *S. mediterranea* Doktorant postanowił poznać jeden z aspektów procesu pobierania i transportu dsRNA w organizmie *S. mediterranea* jakim jest funkcjonowanie transporterów dsRNA. Jako cel pracy Doktorant postanowił zbadać u *S. mediterranea* występowanie oraz funkcje białek, które są homologiczne do białka SID-1 uczestniczącego w procesie transportu dsRNA u nicienia *Caenorhabditis elegans*.

Wstęp literaturowy stanowi bardzo pomocne wprowadzenie do tematyki pracy, ponieważ objaśnia kluczowe zagadnienia związane z fizjologią i procesami regeneracyjnymi u *S. mediterranea*, a także mechanizmem RNAi u zwierząt. Ponadto Doktorant omówił stan wiedzy na temat mechanizmów pobierania dsRNA ze środowiska, w oparciu przede wszystkim o badania nicieni *C. elegans*. W tym kontekście szczególnie szeroko objaśnił sposób działania błonowego białka SID-1, które u *C.*

C. elegans funkcjonuje jako kanał biernie transportujący RNA. Ponadto przedstawił możliwe alternatywne funkcje genów homologicznych do SID-1 u kręgowców. Co ciekawe znacznie mniej wiadomo na temat występującego u nicieni białka SID-2, które również jest białkiem błonowym, prawdopodobnie funkcjonującym jako receptor w endocytotycznym pobieraniu dsRNA. Podsumowując, w tej części pracy Doktorant bardzo przekonująco uzasadnił duże znaczenie badań zdefiniowanych jako cel niniejszej rozprawy, oraz przedstawił aktualny stan wiedzy w tej dziedzinie.

Swoje badania Pan Cezary Odrzygóźdź rozpoczął od zastosowania analizy bioinformatycznej do znalezienia odpowiedzi na pytanie czy u *S. mediterranea* występują białka homologiczne do SID-1 i SID-2 z *C. elegans*. Wyniki tej analizy pozwoliły mu na wskazanie 3 białek homologicznych do SID-1, natomiast nie wykazały istnienia homologów SID-2 u tego wyplawka. Następnie przy pomocy metody ddPCR Doktorant wykrył obecność transkryptów tych trzech genów, co potwierdza, że ulegają one ekspresji u *S. mediterranea*. Stwierdzenie obecności białek homologicznych do SID-1 u *S. mediterranea* jest ważną obserwacją, ponieważ sugeruje możliwą drogę transportu dsRNA do organizmu tego wyplawka. Jednocześnie brak genu dla białka homologicznego do SID-2 sugeruje różnice w mechanizmie transportu dsRNA w porównaniu do *C. elegans*. W opisie tych wyników zabrakło mi ilustracji pokazującej przyrównanie sekwencji (*sequence alignment*) odkrytych przez Doktoranta trzech białek homologicznych do SID-1. Pozwoliłoby to czytelnikowi na stwierdzenie, np. na ile białka te są podobne do siebie na poziomie sekwencji, albo czy posiadają pewne domeny takie same, a inne różniące je od siebie, lub inaczej połączone ze sobą. Cechy te mogłyby zasugerować na ile białka te mogą pełnić odmienne, a na ile nakładające się funkcje.

Następnie Doktorant sprawdził jakie jest rozmieszczenie transkryptów genów *Smed-sidt1-3* w oparciu o istniejące bazy danych. Wykonał także eksperymenty mające na celu określenie rozmieszczenia tych transkryptów za pomocą metody WISH. Porównanie informacji odczytanych z dwóch baz danych oraz uzyskanych eksperymentalnie przez Doktoranta wykazało zgodność lokalizacji dla *Smed-sidt1* (parenchyma), natomiast odmienne obrazy dla *Smed-sidt2* (według własnych danych eksperymentalnych Doktoranta: lokalizacja jelitowa) i *Smed-sidt3* (rozmieszczenie rozproszone). Są to interesujące dane i mimo rozbieżności są zgodne co do tego, że poszczególne białka SIDT1-3 mogą występować m. in. w parenchymie lub w regionie jelitowym tego wyplawka. W kontekście tych danych poprosiłbym Doktoranta w czasie

obrony pracy doktorskiej o przedyskutowanie jakie mogą być przyczyny rozbieżności dotyczących tkankowospecyficjnej ekspresji badanych białek widoczne w bazach danych oraz w eksperymentach przeprowadzonych przez Doktoranta.

W kolejnym etapie prac Doktorant dokonał zbadania przewidywaną topologię badanych białek i porównał z topologią homologicznych białek z innych organizmów. Wyniki tej analizy wykazały duże podobieństwo tych białek. Cechą charakterystyczną białka *Smed-sidt3* była natomiast obecność dodatkowych regionów transmembranowych pochodzących z sekwencji N-końcowej. Co ciekawe, wszystkie trzy białka zawierały motywy sekwencji charakterystyczne dla białek wiążących cholesterol. Czy mógłbym poprosić o przedyskutowanie w czasie obrony pracy jakie wnioski dotyczące funkcji tych białek wynikają z porównania ich przewidywanych struktur? Jaka może być funkcja N-końcowych domen o strukturze β -kartki, które są zlokalizowane wewnątrzkomórkowo?

W ostatnim, obszernym etapie badań Pan Cezary Odrzygóź postanowił sprawdzić, czy zgodnie z przewidywaniem wynikającym z ich homologii do SID-1 z *C. elegans*, białka *Smed-SIDT1-3* transportują cząsteczki RNA. Aby to sprawdzić dokonał wyciszenia ich ekspresji za pośrednictwem mechanizmu RNAi przez podanie dsRNA przeciwko transkryptom *Smed-sidt1-3* za pomocą iniekcji do światła jelita. Metoda ta była skuteczna prowadząc do obniżenia poziomu transkryptów tych genów. Ciekawy aspekt tego eksperymentu polegał na tym, że polegały one na podawaniu dsRNA w celu wyciszenia ekspresji genów, od których produktów białkowych zależy pobranie tego dsRNA. Czy to oznacza, że istnieje jedynie krótkie okno czasowe dla stosowania dsRNA do wyciszenia *Smed-sidt1-3* zanim poziom tych białek obniży się w błonie komórkowej prowadząc do ograniczenia pobierania dsRNA? Jak długi jest czas półtrwania tych białek? Dodatkowe pytanie dotyczące tych eksperymentów jest związane z faktem, że dsRNA dla wyciszenia *Smed-SIDT1-3* były podawane do światła jelita poprzez iniekcję. Czy w takich warunkach jest możliwe, że dsRNA dostaje się do organizmu wypływka przez uszkodzenie ściany jelita spowodowane nakłuciem, a nie tylko przez pobranie przez komórki ściany jelita? Czy sprawdzano skuteczność wyciszania *Smed-SIDT1-3* gdy dsRNA był podawany z pokarmem? Doktorant sprawdzał także jakie są zależności pomiędzy stosowaniem dsRNA przeciwko jednemu z trzech genów tych białek a wyciszeniem pozostałych (str. 79). Czy obserwowane zależności mogą wynikać z właściwości wybranej do tego celu sekwencji dsRNA (podobieństwo sekwencji lub jej



dostępność w transkrypcie)? Czy sprawdzano efekt stosowania innych sekwencji dsRNA do wyciszenia tych genów?

Po ustaleniu efektu wyciszenia ekspresji genów *Smed-sidt1-3* Doktorant zbadał czy dodatkowe podanie dsRNA prowadzącego do wyciszenia ekspresji genu β -kateniny wywoła scharakteryzowany uprzednio efekt fenotypowy (dwugłowość). Dane te pokazały, że uprzednie wyciszenie genów *Smed-sidt1-3* zapobiegało pojawieniu się tego efektu fenotypowego, co zinterpretowano jako spowodowane zahamowanym pobieraniem dsRNA ze światła jelita. W tych eksperymentach dsRNA dla wyciszenia *Smed-sidt1-3* był podawany z pokarmem, a nie na drodze iniekcji. Ponadto Doktorant zbadał, czy wprowadzenie do błony cytoplazmatycznej komórek *D. melanogaster* białek Smed-SIDT1-3 spowoduje nabycie przez te komórki zdolności do pobierania siRNA. Pozytywny wynik tych badań potwierdza, że białka Smed-SIDT1-3 posiadają zdolność do transportu cząsteczek RNA przez błonę komórkową.

Podsumowując, przeprowadzone przez Doktoranta badania pozwoliły na ustalenie, że u *S. mediterranea* występują trzy białka homologiczne do SID-1. Doktorant zastosował różnorodne metody badawcze po to aby pokazać, że białka te uczestniczą w transporcie RNA, co jest bardzo ważną obserwacją z punktu widzenia zrozumienia mechanizmów regulacyjnych zależnych od egzogenego RNA u *S. mediterranea*.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.), Ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.) oraz w Sposobie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (uchwała Rady Naukowej ICHB PAN nr 99/2022/Internet z dnia 9 czerwca 2022 r.). w związku z tym wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie Pana mgr. inż. Cezarego Odrzygóźdźcia do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Mikołaj Olejniczak

Mikołaj Olejniczak