

Poznań, 27.08.26

dr hab. Katarzyna Rolle, prof. ICHB PAN

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Agaty Jolanty Barszcz

pt. „*Rola białek RBMXL3 oraz DDX53 w regulacji metabolizmu RNA w komórkach linii płciowej człowieka*”

wykonanej w Instytucie Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

pod kierunkiem **dr hab. n. med. Natalii Rozwadowskiej, prof. IGC PAN**

1. Charakterystyka formalna rozprawy

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Agaty Jolanty Barszcz pt. „*Rola białek RBMXL3 oraz DDX53 w regulacji metabolizmu RNA w komórkach linii płciowej człowieka*” została przygotowana w Instytucie Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk pod kierunkiem dr hab. n. med. Natalii Rozwadowskiej, prof. IGC PAN.

Rozprawa ma formę spójnego tematycznie cyklu trzech prac naukowych, obejmującego jedną pracę przeglądową oraz dwie prace oryginalne. Pierwsza z prac, „*In vitro models for human germ cells and spermatogenesis research: concepts and perspectives*”, stanowi przegląd aktualnie dostępnych modeli wykorzystywanych w badaniach ludzkich komórek płciowych i spermatogenezy. Druga praca, „*Multi-omic screening identifies RBMXL3 as a primate-specific RNA-binding protein and candidate regulator of RNA metabolism in human spermatogenesis*”, została przyjęta do druku w czasopiśmie *Cellular & Molecular Biology Letters*. Trzecia, „*The RNA helicase DDX53 (CAGE) contributes to RNA metabolism in a human germ cell model*”, została udostępniona jako preprint i w chwili przygotowania rozprawy znajdowała się w trakcie recenzji.

Rozprawa obejmuje obszerny wstęp teoretyczny, sformułowanie hipotezy i celów pracy, omówienie publikacji wchodzących w skład cyklu, wnioski, streszczenia w języku polskim i angielskim, bibliografię oraz oświadczenia współautorów.

Wstęp rozprawy stanowi bardzo dobre wprowadzenie do zagadnień będących przedmiotem pracy. Doktorantka przedstawia kolejne etapy rozwoju męskich komórek płciowych i spermatogenezy, a następnie koncentruje się na mechanizmach metabolizmu RNA, w szczególności alternatywnym splicingu, regulacji stabilności RNA, kompleksach mRNP oraz funkcjach białek wiążących RNA. Istotną część wstępu stanowi także przedstawienie biologii RBMXL3 i DDX53 oraz przesłanek wskazujących na możliwość ich udziału w regulacji procesów zachodzących w męskich komórkach płciowych. Uważam, że część literaturowa została przygotowana bardzo starannie. Jest logicznie skonstruowana, dobrze udokumentowana literaturowo i w odpowiedni sposób prowadzi czytelnika od biologii spermatogenezy do problemu badawczego będącego przedmiotem rozprawy.

2. Przedmiot i cele rozprawy oraz zastosowana metodyka badawcza

Przedmiotem rozprawy jest poznanie funkcji dwóch stosunkowo słabo scharakteryzowanych białek związanych z metabolizmem RNA – RBMXL3 oraz DDX53 – w kontekście biologii męskich komórek płciowych człowieka.

Podjęcie tej tematyki uważam za w pełni uzasadnione. Spermatogeneza jest procesem wymagającym wyjątkowo precyzyjnej regulacji ekspresji genów, w której szczególnie istotną rolę odgrywają mechanizmy potranskrypcyjne. Jednocześnie wiele białek wiążących RNA uczestniczących w tych procesach pozostaje słabo poznanych, szczególnie w odniesieniu do biologii człowieka.

Przesłanką do podjęcia badań nad RBMXL3 oraz DDX53 były między innymi wyniki wcześniejszych analiz genetycznych wskazujące te geny jako potencjalnie związane ze spermatogenezą człowieka oraz ich charakterystyczny profil ekspresji w męskiej gonadzie. Doktorantka postawiła hipotezę, że RBMXL3 oraz DDX53 uczestniczą w regulacji procesów zachodzących w męskich komórkach płciowych człowieka. Głównym celem pracy była identyfikacja sieci powiązań oraz molekularnych interaktorów obu białek w kontekście rozwoju męskich komórek płciowych i spermatogenezy.

Do realizacji tego celu wykorzystano linię komórkową TCam-2, wywodzącą się z ludzkiego nasienia i wykazującą szereg cech molekularnych zbliżonych do pierwotnych ludzkich komórek płciowych. Przygotowano modele komórkowe z nadekspresją znakowanych epitopem FLAG białek RBMXL3 i DDX53, a następnie zastosowano szeroki zestaw nowoczesnych metod biologii molekularnej, transkryptomiki i proteomiki.

W badaniach wykorzystano między innymi RT-qPCR, Western blot, immunofluorescencję i mikroskopię konfokalną, frakcjonowanie komórkowe, immunohistochemię, RNA-seq, eCLIP-seq, ChIP-seq oraz koimmunoprecypitację sprzężoną ze spektrometrią mas. Dodatkowo w przypadku RBMXL3 przeprowadzono funkcjonalny test retrotranspozycji elementów LINE-1.

Dobór metod uważam za bardzo dobry. Szczególnie wartościowe jest zastosowanie podejścia wielkoskalowego, umożliwiającego analizę badanych białek na kilku poziomach organizacji molekularnej – od lokalizacji subkomórkowej, poprzez interakcje RNA–białko i białko–białko, aż do zmian transkryptomicznych i alternatywnego splicingu. Takie podejście pozwoliło Doktorantce uzyskać szeroki obraz potencjalnych funkcji obu białek.

3. Najważniejsze wyniki uzyskane w trakcie realizacji pracy

Rozprawa przedstawia wyniki rozbudowanych i w większości dobrze zaplanowanych badań. Do najważniejszych osiągnięć pracy zaliczam:

1. **Scharakteryzowanie lokalizacji komórkowej RBMXL3 i DDX53** oraz potwierdzenie ekspresji obu białek w ludzkiej męskiej gonadzie. RBMXL3 wykazywało przede wszystkim lokalizację jądrową i wzbogacenie we frakcji chromatynowej, podczas gdy DDX53 lokalizowało się głównie w cytoplazmie, przy częściowej obecności w jądrze.
2. **Wykazanie wpływu RBMXL3 na ekspresję i alternatywny splicing wybranych genów**, w tym FOS, YY1, GJA1 i HNRNPH1, związanych między innymi z proliferacją, funkcjonowaniem spermatogoniów oraz komunikacją między komórkami somatycznymi i germinalnymi.
3. **Zidentyfikowanie szerokiego repertuaru RNA wiązanych przez RBMXL3**, obejmującego między innymi transkrypty genów związanych z utrzymaniem integralności genomu, regulacją chromatyny oraz procesami istotnymi dla prawidłowego przebiegu spermatogenezy.
4. **Identyfikację potencjalnych interaktorów białkowych RBMXL3**, w tym białek związanych z metabolizmem RNA i alternatywnym splicingiem.
5. **Wykazanie zdolności RBMXL3 do silnego ograniczania retrotranspozycji elementów LINE-1**. Wynik ten uważam za jeden z najbardziej interesujących funkcjonalnie rezultatów całej rozprawy, ponieważ wskazuje na potencjalny związek RBMXL3 z ochroną integralności genomu komórek linii płciowej.
6. **Wykazanie wpływu DDX53 na ekspresję oraz alternatywny splicing genów**, w tym MZT1, TFAM, SRSF1 i SEPTIN7, związanych z funkcją centrosomu, mitochondriów, regulacją splicingu oraz dojrzewaniem komórek płciowych.
7. **Zidentyfikowanie szerokiej puli RNA wiązanych przez DDX53** oraz sieci jego potencjalnych interaktorów białkowych, obejmujących między innymi białka związane z metabolizmem RNA i eksportem mRNA.
8. **Zaobserwowanie struktur cytoplazmatycznych wzbogaconych w DDX53, przypominających granule germinalne**, co stanowi interesującą przesłankę wskazującą na potencjalną rolę tego białka w organizacji wyspecjalizowanych kompleksów związanych z metabolizmem RNA.

Uzyskane wyniki tworzą spójny obraz obu białek jako potencjalnych regulatorów metabolizmu RNA w komórkach męskiej linii płciowej, przy czym wskazują również na wyraźne różnice w ich lokalizacji oraz prawdopodobnych mechanizmach działania.

4. Znaczenie uzyskanych wyników

Za szczególnie istotny aspekt rozprawy uważam podjęcie badań nad białkami, których funkcja w kontekście rozwoju męskich komórek płciowych człowieka była dotychczas bardzo słabo poznana.

Badania spermatogenezy człowieka są trudne zarówno ze względu na ograniczoną dostępność materiału biologicznego, jak i brak modeli eksperymentalnych umożliwiających pełne odtworzenie tego procesu in vitro.

Dodatkowym problemem jest ograniczona możliwość bezpośredniego przenoszenia obserwacji uzyskanych w modelach zwierzęcych na biologię człowieka. Z tego względu badania identyfikujące potencjalne, specyficzne dla człowieka lub naczelných regulatory procesów zachodzących w komórkach germinalnych mają dużą wartość poznawczą. Szczególnie interesujące są wyniki dotyczące RBMXL3, białka specyficznego dla naczelných. Połączenie danych transkryptomicznych, analiz interakcji RNA-białko i białko-białko oraz funkcjonalnego testu retrotranspozycji LINE-1 pozwoliło wskazać potencjalne mechanizmy jego działania. Wyniki dotyczące DDX53 również wskazują na udział tego białka w regulacji metabolizmu RNA i sugerują interesujący kierunek dalszych badań związany z jego potencjalnym udziałem w strukturach przypominających granule germinalne. Uzyskane wyniki nie tylko poszerzają wiedzę dotyczącą molekularnej regulacji rozwoju męskich komórek płciowych, ale mogą również stanowić punkt wyjścia do dalszych badań nad molekularnymi podstawami niepłodności męskiej.

5. Komentarze i pytania

1. Model TCam-2 i możliwość odnoszenia wyników do spermatogenezy człowieka

Podstawowym modelem wykorzystanym w obu pracach eksperymentalnych jest linia TCam-2. Jest ona niewątpliwie bardzo użytecznym i dobrze scharakteryzowanym modelem ludzkich komórek germinalnych, jednak wywodzi się z nasieniaka i odzwierciedla przede wszystkim wybrane cechy wczesnych komórek linii płciowej.

W związku z tym chciałabym zapytać Doktorantkę, które z przedstawionych w rozprawie wniosków uważa za możliwe do bezpośredniego odniesienia do fizjologicznej spermatogenezy człowieka, a które powinny być na obecnym etapie ograniczone do modelu TCam-2? Jaki model eksperymentalny Doktorantka wybrałaby jako kolejny do funkcjonalnej walidacji uzyskanych wyników?

2. Nadekspresja RBMXL3 i DDX53 jako podstawowy model eksperymentalny

Znaczna część wniosków dotyczących funkcji RBMXL3 oraz DDX53 została oparta na modelach nadekspresji. Jest to uzasadnione podejście do pierwszej charakterystyki słabo poznanych białek, jednak nadekspresja może prowadzić zarówno do niefizjologicznych interakcji, jak i zmian wtórnych wynikających z wysokiego poziomu badanego białka.

Czy Doktorantka podejmowała próby obniżenia ekspresji RBMXL3 lub DDX53, np. z wykorzystaniem siRNA, shRNA lub metod edycji genomu? Czy uzyskane wyniki pozwalają przewidzieć, jaki fenotyp powinien wystąpić po utracie funkcji każdego z tych białek?

3. Bezpośrednie i pośrednie efekty działania RBMXL3 i DDX53

Analizy RNA-seq wykazały zmiany ekspresji i alternatywnego splicingu licznych genów, natomiast eCLIP umożliwił identyfikację transkryptów bezpośrednio wiązanych przez badane białka.

Czy połączenie obu zestawów danych pozwoliło Doktorantce wskazać grupę transkryptów, dla których istnieją najsilniejsze dowody na bezpośrednią regulację przez RBMXL3 lub DDX53? Innymi słowy – które z obserwowanych zmian Doktorantka uważa za najbardziej prawdopodobne bezpośrednie efekty działania badanych białek?

4. RBMXL3 wykazuje wyraźną lokalizację jądrową i wzbogacenie we frakcji chromatynowej

W analizie Co-IP-MS zidentyfikowano jednak 16 potencjalnych interaktorów białkowych.

a) Czy wiadomo, jaka część tych białek również lokalizuje się w jądrze komórkowym? Na ile zgodność lokalizacji subkomórkowej była brana pod uwagę przy ocenie biologicznego znaczenia interakcji zidentyfikowanych metodą Co-IP-MS?

b) Dla EIF4A3 i DDX39B wykazano miejscową kolokalizację z RBMXL3 metodą immunofluorescencji. Czy kolokalizacja ta występuje w określonych strukturach lub domenach jądrowych i czy jej charakter może wskazywać, w jakich kompleksach związanych z metabolizmem RNA działa RBMXL3?"

c) Jak Doktorantka interpretuje wyraźne wzbogacenie RBMXL3 we frakcji chromatynowej przy jednoczesnym braku powtarzalnych sygnałów w ChIP-seq? Czy może to wskazywać, że RBMXL3 jest związane z chromatyną pośrednio, np. poprzez RNA lub kompleksy białkowe, a nie poprzez bezpośrednie oddziaływanie z DNA?"

5. RBMXL3 i retrotranspozycja LINE-1

Wykazanie silnego hamowania retrotranspozycji LINE-1 przez RBMXL3 jest jednym z najbardziej interesujących wyników pracy. Jednocześnie mechanizm tego zjawiska pozostaje niejasny.

Jakiego mechanizmu działania RBMXL3 spodziewa się Doktorantka? Czy efekt ten może wynikać z bezpośredniego wiązania RNA LINE-1, wpływu na jego stabilność lub translację, czy raczej z rekrutacji innych czynników regulujących aktywność retrotranspozonów? Jakie doświadczenie pozwoliłoby najlepiej rozróżnić te możliwości?

6. DDX53 i struktury przypominające granule germinalne

Bardzo interesującą obserwacją jest obecność DDX53 w strukturach cytoplazmatycznych przypominających granule germinalne. Na obecnym etapie określenie tych struktur jako granul germinalnych pozostaje jednak ostrożną interpretacją morfologiczną.

Jakie markery Doktorantka wykorzystałaby do jednoznacznego określenia charakteru tych struktur? Czy mogłyby to być również inne kondensaty RNP, np. P-bodies lub granule stresowe? Jakie doświadczenia pozwoliłyby ewentualnie rozstrzygnąć tę kwestię?

7. Funkcjonalne znaczenie zidentyfikowanych sieci molekularnych

Praca dostarcza bardzo dużej liczby danych dotyczących potencjalnych interaktorów RNA i białkowych RBMXL3 oraz DDX53. Jest to niewątpliwa wartość rozprawy, ale jednocześnie rodzi pytanie o hierarchię biologicznego znaczenia tych interakcji.

Gdyby Doktorantka miała wybrać jeden mechanizm molekularny dla RBMXL3 i jeden dla DDX53 do dalszych badań funkcjonalnych, które z nich uznałaby za najbardziej obiecujące i dlaczego?

8. Znaczenie uzyskanych wyników

Punktem wyjścia do badań nad RBMXL3 i DDX53 były między innymi wyniki analiz genetycznych prowadzonych u mężczyzn z zaburzeniami płodności.

Czy na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka uważa, że RBMXL3 lub DDX53 mogą w przyszłości mieć znaczenie diagnostyczne w niepłodności męskiej? Jakich danych brakuje obecnie, aby przejść od obserwacji molekularnych przedstawionych w rozprawie do wykazania związku przyczynowego między zaburzeniem funkcji tych białek a niepłodnością?

6. Podsumowanie

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Agaty Jolanty Barszcz dotyczy ważnego i aktualnego problemu badawczego, jakim jest molekularna regulacja rozwoju męskich komórek płciowych człowieka.

Na szczególne podkreślenie zasługuje kompleksowość zastosowanego podejścia eksperymentalnego. Doktorantka wykorzystała nowoczesne metody biologii molekularnej, transkryptomiki i proteomiki, dzięki czemu możliwa była wielopoziomowa charakterystyka dwóch słabo dotychczas poznanych białek – RBMXL3 oraz DDX53.

Za najważniejszy rezultat rozprawy uważam wykazanie, że oba białka są związane z regulacją metabolizmu RNA w ludzkim modelu komórek germinalnych oraz identyfikację ich potencjalnych celów RNA i interaktorów białkowych. Szczególnie interesujące są wyniki wskazujące na udział RBMXL3 w ograniczaniu retrotranspozycji LINE-1 oraz obserwacja struktur zawierających DDX53, które mogą być związane z organizacją metabolizmu RNA w komórkach germinalnych.

Jednocześnie należy podkreślić, że zastosowany model TCam-2 oraz oparcie znacznej części analiz na nadekspresji badanych białek ograniczają możliwość bezpośredniego przenoszenia uzyskanych wyników na fizjologiczną spermatogenezę człowieka. Nie traktuję tego jednak jako istotnej słabości rozprawy, lecz jako naturalne ograniczenie pionierskich badań nad słabo scharakteryzowanymi białkami i jednocześnie bardzo dobry punkt wyjścia do dalszej walidacji funkcjonalnej w bardziej zaawansowanych modelach.

Całościowo oceniam rozprawę bardzo pozytywnie. Doktorantka wykazała umiejętność formułowania problemów badawczych, stosowania zaawansowanych metod eksperymentalnych, analizy dużych zbiorów danych oraz krytycznej interpretacji uzyskanych wyników, a także pracy w dużym zespole badawczym. Przedstawione badania stanowią oryginalny wkład w poznanie mechanizmów regulacji metabolizmu RNA w ludzkich komórkach linii płciowej.

7. Wniosek końcowy

W mojej ocenie przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Agaty Jolanty Barszcz pt. „*Rola białek RBMXL3 oraz DDX53 w regulacji metabolizmu RNA w komórkach linii płciowej człowieka*” stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego, potwierdza szeroką wiedzę teoretyczną Doktorantki oraz jej umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, spełnia tym samym wszystkie warunki stawiane kandydatom w Ustawie – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz.85 z późniejszymi zmianami).

Zwracam zatem się do Rady Naukowej Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu o dopuszczenie mgr Agaty Jolanty Barszcz do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. Jednocześnie, mając na uwadze walory merytoryczne recenzowanej rozprawy oraz jakość prac stanowiących jej trzon, wnoszę do Rady Naukowej o jej wyróżnienie.

Katarzyna Rolle