

Warszawa, 20.11.2023

Marta B Wiśniewska  
Laboratorium Neurobiologii Molekularnej  
Centrum Nowych Technologii UW  
ul. Banacha 2C  
02-097 Warsaw, Poland  
E.mail: [m.wisniewska@cent.uw.edu.pl](mailto:m.wisniewska@cent.uw.edu.pl)

#### RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ KISHORA GAWADE

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pana Kishora Gawade została wykonana na Uniwersytecie Adama Mickiewicza w Poznaniu pod kierunkiem dr hab. Katarzyny Raczyńskiej. Rozprawa obejmuje pracę oryginalną opublikowaną w Scientific reports, pracę przeglądową opublikowaną w WREs, krótkie omówienia tych publikacji oraz opis dwóch dodatkowych projektów. Rozprawa ma więc formę mieszaną. Ogólnym obszarem badań Doktoranta były małe niekodujące RNA. Jest to fascynująca nowa dziedzina, gwałtownie się rozwijająca, otwierająca nowy wymiar w postrzeganiu regulacji ekspresji genów, z potencjałem aplikacyjnym.

Badania opisane w rozprawie dotyczyły roli FUS, białka wiążącego RNA, w regulacji małego jąderkowego RNA (snoRNA), w kontekście stwardnienia zanikowego bocznego. Najważniejszą, bo najwięcej naukowo wnoszącą, częścią rozprawy jest wspomniana praca oryginalna, w której wykazano, że białko FUS reguluje ekspresję snoRNA i modyfikacje rRNA. Jest to nowość, ponieważ do tej pory znany był udział FUS jedynie w regulacji ekspresji mikroRNA. Sama praca jest świetnie napisana, co ułatwia zrozumienie i docenienie badań. Badania zostały przeprowadzone w linii ludzkich komórek HEK293T oraz neuroblastomy SH-SY5Y. Stosując metody sekwencjonowania nowej generacji RNA-seq, Ribo-Meth-seq i HydraPsi-seq zanalizowano poziom ekspresji małych RNA oraz modyfikacji rRNA (metylacji i pseudourydylacji) w komórkach kontrolnych oraz z nokautem *FUS* lub mutacją R495X w genie *FUS*. Jest to mutacja występująca u osób dotkniętych rodzinną formą stwardnienia zanikowego bocznego. Nokaut i mutacja zostały wprowadzone metodą CRISPR/Cas9. Ponadto komórki SHY5Y hodowane były w

warunkach utrzymania proliferacji lub wywołania różnicowania, co poszerzyło pracę o aspekt rozwojowy. Zastosowano także metodę SUnSET do zbadania wpływu zaobserwowanych modyfikacji rRNA pod wpływem wpływu nokautu/mutacji *FUS* na ogólny poziom translacji. Wymieniam te różne metody, żeby zwrócić uwagę na umiejętność skorzystania w projekcie z najbardziej zaawansowanych metod biologii molekularnej, kompleksowe podejście do projektu badawczego oraz na ogrom wykonanej pracy przy przygotowywaniu materiału do badań i analizach otrzymanych danych wysokoprzepustowych.

Wiodącymi autorami artykułu w Scientific reports są Pan Kishor Gawade – pierwszy autor, i Promotorka – autorka korespondująca. Ponadto praca ma 6 współautorów z Poznania, Kopenhagi i Nancy. Biorąc pod uwagę wyżej wspomnianą złożoność badań, udział współpracowników jest oczywisty. Recenzent rozprawy chciałby jednak wiedzieć, która część jest samodzielnym wkładem Doktoranta. Z załączonych oświadczeń rozumiem, że Doktorant brał udział zarówno w rozwoju koncepcji badań, przeprowadzaniu doświadczeń, analizie i interpretacji danych, jak i pisaniu samego manuskryptu. Jednak nie wiem, w jakim stopniu w której części badań. Jeżeli nie w oświadczeniu, to powinno to zostać dookreślone w omówieniu badań.

Jedną z konkluzji artykułu w Scientific reports był postulowany udział wzrostu specyficznych modyfikacji rRNA w patomechanizmie stwardnienia zanikowego bocznego. Aby uzyskać potwierdzenie dla tych przypuszczeń, w nieopublikowanej części pracy doktorskiej Doktorant powtórzył analizę metylacji rRNA tym razem w komórkach wyprowadzonych od trzech pacjentów i dwóch osób kontrolnych. Były to fibroblasty, indukowane komórki pluripotencjalne oraz komórki prekursorowe neuralne dostarczone przez współpracowników z Uniwersytetu w Rostock. Dodatkowo Doktorant różnicował otrzymane komórki neuralne do motoneuronów, ponieważ właśnie specyficznie te komórki ulegają degeneracji w stwardnieniu zanikowym bocznym. Liczba analiz Ribo-Meth była więc ogromna. Niestety wyniki były rozczarowujące. Doktorant zidentyfikował różnice w poziomie metylacji rRNA pomiędzy komórkami z dzikim i zmutowanym genem *FUS* jedynie w kilku-kilkunastu miejscach metylacji i przy zastosowaniu bardzo łagodnych warunków brzegowych istotności. W moim odczuciu zbyt łagodnych, dlatego mam wątpliwości czy można mówić o jakichkolwiek różnicach. Standardowo przyjmuje się odcięcie istotności statystycznej przy wartości  $p$  w teście  $t$  Studenta  $<0,05$ , ale nie w analizach wielkoskalowych, gdzie konieczne jest zastosowanie poprawki dla wielokrotnych porównań. Ponadto zastosowanie sparowanego testu  $t$  jest błędem, bo porównywane były linie wyprowadzone od różnych osób, a więc nic nie uprawnia do określenia ich jako sparowane. Mam też wątpliwości, czy można uznać trzy próbki z tej samej linii wywiedzionej jednorazowo od pacjenta za powtórzenia biologiczne. W końcu kryterium różnicy  $>5\%$  jest niespotykane liberale. Jednocześnie Doktorant zaobserwował niebudzące wątpliwości zwiększenie modyfikacji rRNA w miarę różnicowania komórek pluripotencjalnych do motoneuronów. Jest to wynik poboczny, ale można go też uznać za rodzaj potwierdzenia prawidłowości wykonanych badań i dowód, że brak oczywistych różnic w metylacji rRNA pomiędzy komórkami od osób zdrowych i pacjentów nie wynika z problemów technicznych. W Dyskusji Doktorant m.in. zastanawia się nad przyczynami tego niespodziewanego, negatywnego właściwie, wyniku, i proponuje do dalszych badań inny

model komórkowy stwardnienia zanikowego bocznego, który odzwierciedlałby zmiany zachodzące z wiekiem.

W kolejnej części nieopublikowanych badań Doktorant wykorzystał komórki neuroblastomy SH-SY5Y kontrolne i z nokautem *FUS*, by udowodnić, że białko *FUS* reguluje procesowanie snRNA, a konkretnie powstawanie tzw. sdRNA. Ten wynik jest ciekawym uzupełnieniem pracy z Scientific reports i z pewnością będzie początkiem dalszych badań nad mechanizmami regulacji procesowania małych RNA przez *FUS*.

Częścią rozprawy jest także artykuł przeglądowy napisany razem z Promotorką, w którym przedyskutowano zjawisko imprintingu snoRNA w neurorozwoju, oraz postawiono tezę o roli zaburzeń imprintingu snoRNA w etiologii szeregu chorób.

Na koniec chcę się odnieść do struktury i zawartości samej rozprawy. Struktura jest dosyć nietypowa, ponieważ każda część badań omówiona jest osobno. Wadą tej struktury jest brak powiązania pomiędzy częściami, brak spojrzenia na pracę jako na całość. Częścią łączącą badania jest rozdział Introduction, ale de facto składa się on z niepowiązanych ze sobą akapitów. Nie ma wspólnej dyskusji wyników. Mam nadzieję, że wspólny szerszy obraz pojawi się w czasie obrony. Drugim problemem jest hermetyczny sposób ujmowania treści, polegający na rzucaniu faktami bez ogólniejszego wprowadzenia czy komentarza. W streszczeniu pracy już w pierwszym akapicie pojawia się wszystko - białko *FUS*, snoRNA, metylacje i pseudourydylacje rRNA, snRNA i procesowanie snoRNA. Nie wiadomo, jak się to wszystko ze sobą wiąże i jaki jest cel oraz założenia pracy. W rozdziale Background and Forming the Hypotheses przedmiot badań staje się jasny, ale zarys uzasadnienia badań wprawia w konfuzję i brakuje samych hipotez. Omówienia prac opublikowanych są przeladowane szczegółami, nie są więc tym, czym według mnie powinny być – pokazaniem kontekstu pracy, podsumowaniem głównych wyników. Treść w nich zawartą zrozumiałam dopiero po przeczytaniu artykułów załączonych na końcu, ponieważ akurat artykuły opatrzone są jasnym wprowadzeniem i jasną konkluzją.

Podsumowując recenzję, żałuję, że Doktorant nie zadbał o komfort czytelnika, natomiast wyrażam uznanie dla wysokiego poziomu naukowego i imponującego rozmachu badań. Jestem przekonana, że praca Pana Kishora Gawade pogłębiła wiedzę na temat roli białka *FUS* w regulacji poziomu małego jąderkowego RNA i modyfikacji rRNA oraz przygotowała grunt pod badanie udziału tych mechanizmów w patogenezie stwardnienia zanikowego bocznego. Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa spełnia ustawowe warunki stawiane pracom doktorskim i stawiam wniosek do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne UAM w Poznaniu o dopuszczenie Pana Kishora Gawade do dalszych etapów przewodu doktorskiego.