



Warszawa, 30.11.2015

Recenzja pracy doktorskiej mgr. Łukasza J. Sznajdera pt.: „UDZIAŁ BIAŁEK MBNL W METABOLIZMIE RNA”

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr. Łukasza Sznajdera została wykonana pod kierunkiem Prof. Krzysztofa Sobczaka w Instytucie Biologii Molekularnej i Biotechnologii Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Dystrofie miotoniczne są chorobami powodowanymi przez ekspansje sekwencji mikrosatelitarnych. Ekspansja powtórzeń CTG w obszarze 3' UTR genu DMPK powoduje dystrofię mięśniową typu 1, a ekspansja powtórzeń CCTG w pierwszym intronie genu CNBP dystrofię mięśniową typu 2. W obu przypadkach patogeneza choroby nie jest spowodowaną dysfunkcją genów, w których następują mutacje. Powtórzenia CUG i CCUG w RNA tworzą stabilne struktury drugorzędowe, a transkrypty z powtórzeniami agregują w jądrze kosmówkowym tworząc skupiska zwane *foci*. Do takich struktur z dużym powinowactwem wiążą się białka z rodziny MBNL (Musclebind-like): Mbnl1, Mbnl2 i Mbnl3, które mają podobną budowę i rozpoznają RNA za pomocą palców cynkowych. Białka te uczestniczą w regulacji alternatywnego składania pre-mRNA oraz formowaniu 3' końca mRNA. Uważa się, że wiązanie białek MBNL do *foci* RNA uszczupla pulę wolnych białek MBNL co prowadzi do zaburzeń alternatywnego składania pre-mRNA, a w konsekwencji dystrofii miotonicznych. Rola białek MBLN w regulacji składania pre-mRNA i patogenezie dystrofii miotonicznych nie jest jednak w pełni zrozumiana.

W przedstawionej do recenzji rozprawie Autor starał się lepiej zrozumieć funkcje białek MBNL wykorzystując różne podejścia badawcze częściowo oparte o analizy wysokoprzepustowe.

Dysertacja ma klasyczną budowę i składa się ze Wstępu, rozdziałów opisujących Metody, Wyniki oraz Dyskusję. Ma ponad 100 stron, jest obficie ilustrowana i posiada bogatą literaturę. Praca jest napisana w sposób klarowny, dobrym językiem.

Wstęp wprowadza czytelnika w tematykę rozprawy. Opisana jest dotychczasowa wiedza na temat białek MBNL i ich roli w patogenezie dystrofii miotonicznej. Pewien niedosyt pozostawia brak opisu mechanizmów regulacji alternatywnego składania pre-mRNA – procesu regulowanego przez białka MBNL.

Sekcja Materiały i Metody jest również wyczerpująca. Metody są opisane bardzo czytelnie i zrozumiale.

Wyniki podzielano są na 4 częściowo niezależne sekcje.

1) „Przygotowanie wysokorozdzielczych, całotranskryptomowych map oddziaływania białek Mbnl z RNA”

W tej części pracy Autor w celu identyfikacji miejsc wiązania białek MBNL z RNA wykorzystał bardzo trudną technicznie metodę, CLIP-seq (ang., crosslinking and immunoprecipitation of RNA-protein complexes followed by deep sequencing). Niestety w trakcie realizacji doktoratu wyniki analogicznych analiz przeprowadzone przez konkurencyjne grupy zostały opublikowane. W związku z tym Autor we współpracy z bioinformatykami stworzył bazę danych wszystkich wyników analiz CLIP-seq dla białek MBNL. Taka baza może wspomóc przyszłe badania nad tymi białkami.

Podstawowym problemem w analizach typu CLIP-seq jest odróżnianie właściwych oddziaływań od tła. Wydajność chemicznego sieciowania białek z RNA zależy od sposobu oddziaływania. Dla białek z domenami RRM jest ono zwykle bardziej wydajnie niż dla białek oddziałujących z RNA za pomocą palców cynkowych, jak białka z rodziny MBNL. Powoduje to, że dla białek MBNL uzyskanie wiarygodnych wyników może być trudne gdyż poziom tła może być wysoki. Niestety nie ma dobrych narzędzi bioinformatycznych, które pozwalają na odfiltrowanie tła, ponieważ analiza mutacji spowodowanych sieciowaniem jest zazwyczaj niewystarczająca. Dlatego też najważniejsze jest zoptymalizowanie procedury izolacji kompleksów RNA-białko w celu zwiększenia specyficzności i obniżenia poziomu tła. W przedstawionej pracy, poza optymalizacją procesu fragmentacji RNA, takie analizy nie zostały przedstawione. Jediną kontrolą jest

immunoprecypitacja RNA, w której nie zastosowano sieciowania. Mimo to na obrazie autoradiogramu przedstawionego w pracy widoczny jest sygnał na poziomie oczyszczanego białka, co sugeruje że przynajmniej częściowo nieusieciowane RNA oczyszczało się z kompleksem. Może to być źródłem potencjalnego wysokiego poziomu szumu. Dodatkowo nie przeprowadzono kontroli z wykorzystaniem niespecyficznego przeciwciała izotypowego. Wszystko to utrudnia ocenę specyficzności przeprowadzonej procedury, co ma kluczowe znaczenie w ocenie wiarygodności wyników.

Mimo moich krytycznych uwag godne pochwały jest zaangażowanie Autora pracy w ambitny projekt, który mógł zaowocować niezwykle ciekawymi wynikami naukowymi. Ponadto, tak jak napisałem wyżej, zebranie wszystkich wyników CLIP-seq dla białek MBLN w jednej bazie danych może być użyteczne dla badaczy.

2) „Mechanizm i konsekwencje zaburzenia alternatywnego splicingu pre-mRNA NASP w DM”

Ze względu na wysoki poziom tła w wynikach CLIP uzyskanych przez doktoranta oraz innych badaczy w celu zidentyfikowania nowych zaburzeń alternatywnego składania pre-mRNA zależnych od białek MBNL, Autor poza wynikami CLIP-seq, posiłkował się danymi pochodzącymi z mikromierzy. Wśród genów wzbogaconych w odczyty CLIP-seq autor wytypował gen NASP, dla którego istnieje podejrzenie zaburzenia składania pre-mRNA u pacjentów z dystrofią miotoniczną. Kolejne analizy potwierdziły, że poziom ekspresji białek MBNL wpływa na alternatywne składanie pre-mRNA NASP promując włącznie dodatkowego egzonu specyficznego dla izoformy t. Oddziaływanie MBNL z pre-mRNA dla NASP zostało również potwierdzone przez doktoranta. Co ciekawe zaburzenia ekspresji tNASP hamują podziały komórek. Tak więc w tej części doktoratu autor zidentyfikował nowy cel dla białek Mbln, a deregulacja składania pre-mRNA NASP może częściowo wyjaśniać fenotypy związane z dystrofią miotoniczną. Trzeba jednak podkreślić, że dla lepszego zrozumienia analizowanego procesu potrzebne będą dalsze szczegółowe analizy.

3) „Udział białek MBNL i ich izoform w regulacji alternatywnego splicingu”

W kolejnej części wyników Autor starał się zbadać wpływ poszczególnych białek MBNL i ich izoform na regulację alternatywnego składania pre-mRNA dla kilkudziesięciu różnych genów. Modelem badawczym były komórki HeLa

transfekowane wektorami kodującymi różne wersje MBNL ze znacznikiem GFP. Autor wykazał, że przejściowa transfekcja komórek wektorami powoduje modulację alternatywnego składania i że różne formy MBNL mają różny efekt. Można to częściowo wytłumaczyć różnicami w powinowactwie białek MBNL do sekwencji docelowych oraz różnym poziomem ekspresji i lokalizacji komórkowej badanych białek i ich izoform. Wyniki dostarczają nowych informacji o białkach MBNL. Niestety model badawczy stosowany przez doktoranta nie jest optymalny, ponieważ czasowe transfekcje mogą powodować różne poziomy ekspresji w poszczególnych komórkach przez co trudno jest jednoznacznie stwierdzić co jest bezpośrednim źródłem różnej aktywności izoform MBNL.

4) „Udział białek MBNL w agregowaniu transkryptów z wydłużonymi powtórzeniami trójnukleotydowymi CUG w jądrowych foci”.

W ostatniej części wyników doktorant przedstawił analizę agregacji egzogennych MBNL z egzogennymi RNA zawierającymi powtórzenia CUG wykorzystując transfekowane komórki HeLa jako model. Obrazowania powstałych w jądrze komórkowym foci zawierających fluorescencyjne białka MBNL prowadzono z wykorzystaniem zaawansowanych metod mikroskopii konfokalnej. Analizy były wsparte badaniami bezpośredniego oddziaływania białek MBNL z konkretnymi RNA prowadzonymi *in vitro*. Badania wykazały, że wszystkie izoformy białek MBNL agregują w podobny sposób, zaobserwowano jedynie nieznaczne, choć statystycznie istotne różnice. Co istotne we wszystkich przypadkach jest to układ bardzo dynamiczny.

Na końcu każdego z rozdziałów opisujących wyniki autor krótko dyskutuje otrzymane dane i sugeruje dalsze eksperymenty. Części te świadczą o dogłębnym zrozumieniu tematyki badawczej i dojrzałości naukowej doktoranta.

W Dyskusji Autor pobieżnie analizuje uzyskane przez siebie wyniki, co jednak ze względu na to, że bezpośrednia dyskusja znajduje się na końcu każdego z rozdziałów opisujących wyniki wydaje się uzasadnione.

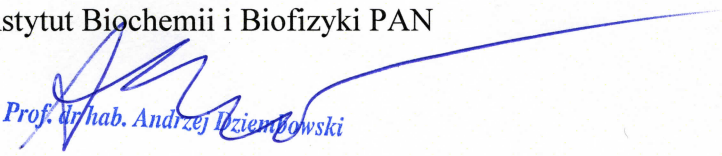
W ogólnej ocenie merytorycznej przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej na podkreślenie zasługuje podjęcie niezwykle ciekawego i ważnego z

medycznego punktu widzenia tematu badawczego. Ponadto ogrom pracy Autora i jego dążenie do poszerzenia naszej wiedzy o roli białek MBNL w regulacji alternatywnego składania pre-mRNA w kontekście dystrofii miotonicznej jest godne pochwały. Autor wykorzystywał różnorodne techniki eksperymentalne od analiz transkryptomicznych, przez eksperymenty in vitro, analizy RNA do zaawansowanych metod mikroskopii konfokalnej. Wszystko to świadczy o dużej wiedzy i sprawności technicznej doktoranta.

Podsumowując, przedstawioną rozprawę doktorską mgr. Łukasza Sznajdera oceniam wysoko. Pomimo uwag uważam, że jest to bardzo dobra praca, zarówno pod względem uzyskanych wyników, jak i sposobu ich prezentacji. Praca ta spełnia ustawowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Dlatego też, zwracam się do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu z prośbą o dopuszczenie pana mgr. Łukasza Sznajdera do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. Andrzej Dziembowski

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN


Prof. dr hab. Andrzej Dziembowski