



INSTYTUT BIOCHEMII I BIOFIZYKI
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Warszawa, 17 maja 2016

Prof. dr hab Magdalena Boguta
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

Recenzja pracy doktorskiej Arkadiusza Kajdasza

**„Potranskrypcyjna regulacja ekspresji genu CELF1 – wpływ na patomechanizm
dystrofii miotonicznej”**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Arkadiusza Kajdasza została wykonana pod kierunkiem dr hab. Krzysztofa Sobczaka. Kierowany przez niego zespół od kilku lat zajmuje się badaniem mechanizmu molekularnego będącego podłożem dystrofii miotonicznej oraz poszukiwaniem możliwych dróg terapii.

Dystrofia miotoniczna typu 1 (DM1) jest chorobą genetyczną wywołaną ekspansją powtórzeń CTG w 3' UTR genu kinazy DMPK, które wywołują agregację mRNA tego genu w jądrze komórkowym. Skupiska zmutowanego mRNA (CUG^{exp}) wiążą specyficzne białka z rodziny MBLN zaangażowane w generalną kontrolę alternatywnego splicingu, poliadenylacji i trwałości RNA. CUG^{exp} aktywują również kinazę PKC, a w następstwie hiperfosforylacji CELF1, innego czynnika odpowiedzialnego za alternatywny splicing, powodując jego stabilizację i zwiększoną aktywność w mięśniach DM1. Aktywność MBLN jest natomiast obniżona wskutek wymiarczkowania tego białka przez agregaty CUG^{exp} . Toteż CELF1 i MBLN w dużej mierze antagonistycznie regulują alternatywny splicing tych samych eksonów. Nie jest to jednak regułą gdyż niektóre eksony są zależne tylko od jednego z tych czynników.

Opóźnianie rozluźnienia mięśni szkieletowych w DM1, tzw. miotonia, wywołana jest zaburzeniem splicingu mRNA CLCN1, kanału jonów chlorkowych. Splicing jest zahamowany przez inaktywację MBNL1, a dodatkowo, wskutek aktywacji CELF1 do mRNA CLCN1 włączany jest alternatywny ekson posiadający przedwczesny kodon stop. Generalne defekty w mechanizmie splicingu powodują także nieprawidłowe dojrzewanie transkryptów innych genów zaangażowanych w patologię DM1: INSR, BIN1 i PKM.

Celem obecnej pracy była identyfikacja innych niż fosforylacja mechanizmów postranskrypcyjnej regulacji CELF1, oraz próby powiązania tej regulacji z genozą DM1. Punktem wyjścia były uzyskane wcześniej w zespole wyniki analiz mikromacierzowych, które wskazywały na zmienioną w DM1 efektywność włączania eksonów w rejonach 5' i 3' UTR genu CELF1. Zakładano, że zmiany te mogą prowadzić do aktywacji CELF1 w komórkach DM1 poprzez zwiększenie poziomu ekspresji lub syntezy innej formy białka. Założenie to autor rozprawy starannie weryfikował na drodze eksperymentalnej.

Istnieje myślenie, że model DM1, nie jest on jednak odpowiedni do badania zmian na poziomie białka CELF1, co potwierdzono również w toku obecnej pracy. Autor badał więc zmiany ekspresji CELF1 w hodowlach komórkowych i w układach *in vitro*.

Podsumowanie wyników

W celu identyfikacji transkryptów zawierających odpowiednie fragmenty rejonów UTR genu CELF1 doktorant wykonał serię eksperymentów RT-PCR. Krytycznymi elementami struktury 5'UTR genu CELF1 są dwa eksony, alternatywny oraz konstytutywny, zawierające odpowiednio, dwa sygnały inicjacji translacji AUG1 i AUG2 (stąd autor nazywa je odpowiednio, eksonem AUG1 i eksonem AUG2).

Dotychczas w literaturze opisano jeden promotor genu CELF1, znany jako P1.

Oprócz transkryptów CELF1 rozpoczynających się od P1, doktorant zidentyfikował także formy mRNA rozpoczynające się od promotora P2. Obie izoformy mRNA powstające z różnych promotorów mogą mieć alternatywnie włączany ekson AUG1 i wówczas syntyzowana jest dłuższa forma białka CELF1. Doktorant stwierdził ponadto zwiększenie ilości krótszych a ubytek dłuższych form transkryptów CELF1 w komórkach DM1, co wiąże się z obniżeniem poziomu włączania alternatywnego eksonu AUG1.

Analiza porównawcza rejonów 3'UTR, zawierających introny oraz alternatywne miejsca poliadenylacji, wykazała, zaburzony poziom izoform 3'UTR w mięśniach szkieletowych niektórych pacjentów z DM1. Autor badał również ekspresję rejonów UTR genu CELF1 w różnych tkankach w trakcie różnicowania mięśni. Stwierdził znaczne zmiany poziomu alternatywnego splicingu w obrębie 5' jak i 3'UTR. W dojrzałych mięśniach szkieletowych obserwował wzrost włączania eksonu AUG1 do 5'UTR oraz ekspresję długiej formy 3'UTR, podczas gdy w płodowych mięśniach szkieletowych poziom włączania tego eksonu był niski, podobny do tego, jaki został stwierdzony w komórkach DM1, a wśród form 3' dominowały warianty krótsze. Wyniki te sugerowały, że alternatywny splicing determinujący długość rejonów UTR może mieć wpływ na zróżnicowanie poziomu ekspresji białka CELF gdyż wydajność translacji będzie wyższa w przypadku krótszej formy 5'UTR.

Założenie to, choć w pełni logiczne, okazało się jednak nieprawdziwe. Stwierdzono to poprzez badanie aktywności lucyferazy wyrażanej z plazmidów posiadających odpowiednie izoformy 5'UTR genu CELF1; różnice okazały się niewielkie i statystycznie nieistotne. Otrzymany wynik sugerował, że zmiany alternatywnego splicingu 5'UTR nie wpływają na wydajność translacji białka CELF1.

Doktorant skupił się więc na badaniu proporcji między dwiema izoformami białka CELF1, produkowanymi odpowiednio, z wykorzystaniem kodonów AUG1 i AUG2. W elegancki sposób przedstawił korelację ekspresji dłuższej formy białka z obecnością eksonu AUG1 w 5'UTR mRNA; poziom dłuższej formy był wysoki w dojrzałych mięśniach szkieletowych, a niższy w sercu i w mózgu. Zgodnie z przewidywaniem uzyskano też efekt obniżenia poziomu dłuższej formy białka CELF1 poprzez wyciszenie ekspresji białka MBNL. Przedstawiono również korelację poziomu ekspresji MBNL w różnych tkankach z poziomem włączania eksonu AUG1 i ekspresji dłuższej formy białka CELF1. Wyniki te sugerowały, że na aktywność CELF1 ma wpływ nie tyle jego sumaryczna ilość, ale względny udział izoform białka. Potwierdzono tę hipotezę badając wpływ nadprodukcji obu form białka CELF1 na alternatywny splicing genów reporterowych; wykazano, że krótsza izoforma wydajniej wyłącza alternatywne eksony z pre-mRNA.

Kolejnym aspektem badania regulacji CELF1 była aktywność alternatywnych miejsc poliadenylacji, ASAP1 i ASAP2, w rejonie 3'UTR. Uzyskane wyniki sugerowały udział MBNL w inhibicji APAS1 i udział, zarówno alternatywnego splicingu, jak i alternatywnej poliadenylacji w regulacji izoform 3'UTR podczas rozwoju tkanek.

Na podstawie analiz baz danych doktorant określił potencjalne miejsca wiązania miRNA w alternatywnych rejonach 3'UTR genu CELF1. Stwierdził wzrost poziomu niektórych z tych miRNA podczas różnicowania mioblastów i zasugerował potencjalny wpływ tych miRNA na translację CELF1. Stwierdził ponadto, że w czasie różnicowania dochodzi do bardziej

efektywnego włączania alternatywnych eksonów wybranych genów komórkowych regulowanych przez CELF1 i MBNL. Udział alternatywnego splicingu tych genów zmniejszał się z kolei w mięśniach szkieletowych DM, co sugeruje wzrost aktywności CELF1 nie tylko w DM1, co było już opisane w literaturze, ale również DM2.

Uwagi krytyczne

1. Autor słusznie zakładał, że nadprodukcja czynników MBNL1 i będzie mieć wpływ na aktywność translacyjną 5'UTR CELF1 białka. W tym celu badał aktywności lucyferazy wyrażanej z plazmidów posiadających odpowiednie izoformy 5'UTR genu CELF1 w obecności plazmidów zapewniających teoretycznie nadprodukcję białek MBNL1 i CELF1. Nie zamieszczono jednak wyniku kontrolnego eksperymentu Western blot, potwierdzającego, że w stosowanym układzie ilości tych białek są rzeczywiście zwiększone. Dlatego uważam, że uzyskany negatywny wynik eksperymentu nie jest w pełni miarodajny. Analogiczna uwaga odnosi się do braku kontroli ilości MBNL w eksperymencie przedstawionym na rys. 4.15.
2. Na rys. 4-12 przedstawiony jest wynik eksperymentu Western-blot z przeciwciałem anti-CELF1 obrazujący dwie formy białka CELF1. Na rysunku brak jest skali; czy rzeczywiście odległość prążków odpowiada różnicy 27 aminokwasów? Ciekawa jestem jaki jest obraz ufosforylowanej formy białka CELF1; czy jest ona widoczna jako prążek, który migruje wyżej na żelu.
3. Na rys. 4.13 przedstawiono korelację alternatywnego splicingu i poziomu izoform białka CELF1 w różnych tkankach. Dlaczego nie wykonano analogicznego eksperymentu dla komórek DM1, choć jest to podstawowe zagadnienie pracy doktorskiej?
4. W celu określenia lokalizacji komórkowej izoform 5' i 3' UTR CELF1 frakcjonowano komórki dwiema różnymi metodami, nie wykonano jednak eksperymentów potwierdzających czystość frakcji, co rzutuje na wiarygodność wyników.
5. Brak jest dyskusji o domniemanych przyczynach różnicy w aktywności obu form białka CELF1. Czy N-terminalny fragment formy dłuższej posiada jakieś szczególne cechy, na przykład sekwencji kierującej białko do określonego subkompartamentu komórkowego?
6. Autor nie ustrzegł się od drobnych błędów edytorskich, literówek i powtórzeń, oraz żargonu laboratoryjnego. Lekturę początkowej partii wyników ułatwiłoby wprowadzenie rysunku przedstawiającego strukturę 5'- i 3' UTR genu CELF1 wraz ze wszystkimi elementami, które są sukcesywnie analizowane. Odpowiednie schematy pojawiają się w dopiero dalszych partiach tekstu i w materiałach i metodach. Analizowane elementy są często nazywane w różny sposób (na przykład wymiennie ekson P1 i ekson AUG1), co utrudnia zrozumienie tekstu.

Komentarz merytoryczny

Recenzowana praca reprezentuje wysoki poziom merytoryczny badań z dziedziny biologii molekularnej związanej z medycyną. Podejmuje aktualny, bardzo istotny problem naukowy związany z podłożem molekularnym dystrofii miotonicznej i dotyczący zmian aktywności białka CELF1. Koncepcja pracy jest spójna. Autor w przekonujący sposób wykazał, że w mięśniach szkieletowych DM dochodzi do zwiększenia aktywności CELF1 nie tylko na poznanej wcześniej drodze hiperfosforylacji ale również poprzez postranskrypcyjne mechanizmy przejawiające się zaburzeniami alternatywnego splicingu rejonów UTR, które

prowadzą do zmiany proporcji między izoformami białka. Według hipotezy autora zaburzenia na postranskrypcyjnych etapach ekspresji CELF1 są najprawdopodobniej konsekwencją niedoboru MBNL w komórkach DM1. Jego wyniki sugerują ponadto, że podobne mechanizmy mogą wpływać na aktywność białka CELF1 podczas różnicowania tkanek. Wyniki te stanowią istotny element nowości naukowej.

W ramach realizacji pracy doktorskiej autor wykonał wiele eksperymentów, wykazując się dociekliwością i pracowitością, oraz dążeniem do rozwikłania problemu mimo dużej ilości wyników negatywnych. Wykazał się logicznym myśleniem, umiejętnościami eksperymentalnymi oraz zdolnością do wykorzystania danych analiz globalnych zdeponowanych w bazach danych przez inne laboratoria. Wyniki opracowano rzetelnie i wnikliwie przedyskutowano.

Praca będzie miała zapewne ciąg dalszy i doktorant poddaje konkretne propozycje kontynuacji. Stanowi to również zaletę recenzowanej rozprawy.

Komentarz edytorski

Praca została przygotowana starannie. Część teoretyczna jest przygotowana bardzo kompetentnie i doskonale wprowadza w tematykę badań. Opis poszczególnych partii wyników poprzedzony jest zwykle krótkim wprowadzeniem teoretycznym i podsumowany konkluzją, ułatwiając zrozumienie opisywanych eksperymentów, które układają się w ciąg logiczny. Dyskusja jest bardzo wyważona, konkluzje nie są posunięte za daleko. Rozprawa doktorska Arkadiusza Kajdasza napisana jest w sposób, który wywołuje zainteresowanie tematem i pobudza do myślenia i jest to jej ogromną zaletą.

Podsumowanie

Podsumowując, uważam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska w pełni spełnia wymogi ustawy o Tytule i Stopniach Naukowych i wnoszę do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Pana mgr Arkadiusza Kajdasza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

M. Bogute