

Recenzja pracy doktorskiej mgr Katarzyny Taylor pt.:

Oddziaływania RNA z białkami MBNL – podstawy strukturalne, potencjalne inhibitory oraz implikacje funkcjonalne

The RNA/MBNL interactions: structural basis, potential inhibitors and functional implications

Praca doktorska mgr Katarzyny Taylor powstała na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza, w Zakładzie Ekspresji Genów Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii, w zespole kierowanym przez prof. UAM dr hab. Krzysztofa Sobczaka. Badania naukowe, jakie prowadziła mgr Taylor, wpisują się w wieloletni nurt badań prowadzonych przez grupę badawczą profesora Sobczaka dotyczący molekularnego podłoża dystrofii miotonicznej (DM).

Rozprawa doktorska jest przygotowana w formie zbioru czterech publikacji naukowych. Publikacje poprzedza Streszczenie w języku polskim i angielskim oraz Oświadczenia promotora, doktorantki i współautorów dotyczące ich udziału w powstawaniu prac naukowych stanowiących rozprawę doktorską. Streszczenie jest zwięzłe, składa się z wprowadzenia i opisu najważniejszych rezultatów badań zebranych w publikacjach. Zawiera także główny cel rozprawy doktorskiej: określenie strukturalnych podstaw oddziaływania białek MBNL z docelowymi RNA, poszukiwanie inhibitorów patogennych kompleksów MBNL/(CUG)^{exp} oraz zbadanie funkcjonalnych następstw ich działania w modelowych komórkach DM1.

Z przekonaniem stwierdzam, że zakładane cele badawcze zostały przez doktorantkę osiągnięte. Dwie stanowiące rozprawę doktorską publikacje dotyczą określenia roli białka z rodziny MBNL w regulacji alternatywnego splicingu w warunkach fizjologicznych. Dwie pozostałe wykorzystują zebraną wiedzę do zastosowania oligonukleotydów lub antybiotyków osłabiających patogenny proces sekwestracji białek MBNL w eksperymentalnej terapii dystrofii miotonicznej. Należy podkreślić, że badania mgr Taylor przyczyniły się do pełniejszego zrozumienia patogenezы DM i funkcji białka MBNL, a dzięki pracy zespołowej, ich

zwięźceniem są bardzo dobre, wielowątkowe publikacje. Recenzent skupił się na tych wątkach publikacji, które były osiągnięciem doktorantki.

Pierwszą zamieszczoną w rozprawie pracą jest publikacja w *Nucleic Acids Research* ***Autoregulation of MBNL1 function by exon 1 exclusion from MBNL1 transcript***. W publikacji przedstawiono mechanizm autoregulacji poziomu ekspresji MBNL1 posługując się modelami komórkowymi, materiałem pochodzącym od pacjentów z dystrofią miotoniczną oraz mysim modelem tej choroby. Doktorantka przeprowadziła wszystkie opublikowane w tej pracy badania *in vitro*. Zidentyfikowała nowe miejsce regulatorowe w pre-mRNA genu *Mbnl1*, do którego wiąże się białko MBNL1. Stosując z jednej strony oligonukleotydy antysensowe (AON), a z drugiej mutanty modelowych RNA potwierdziła istotność 20-nukleotydowego regionu zawierającego motywy konsensusowe YGCY w wiązaniu MBNL1 do RNA. Interesujące są rozważania wpływu struktury RNA zarówno na patogenezę dystrofii miotonicznej, jak i na skuteczność terapii antysensowej.

Podczas lektury tej publikacji nasunęły się recenzentowi następujące pytania. Z opisu w Materials and Methods wynika, że podczas badania *in vitro* wpływu AON na tworzenie kompleksu MBNL1 z transkryptem *Mbnl1* el WT w pierwszym etapie docelowe RNA oraz AON były razem denaturowane w 90°C. Taka sama procedura była zastosowana w kolejnej, opisanej poniżej, publikacji. Prosiłabym o wyjaśnienie konieczności tej denaturacji. Jeśli celem badań było także ocenienie wpływu struktury RNA na hybrydyzację z AON to denaturacja RNA byłaby niewskazana. Dodatkowo, jako chemika zajmującego się m.in. zastosowaniem oligonukleotydów do inhibicji patogennych RNA interesuje mnie, jakie modyfikacje zastosowano w AON. Tego nie znalazłam w publikacji.

Doktorantka zaproponowała strukturę drugorzędową fragmentu MBNL1 el (Figure 1C) na podstawie mapowania enzymatycznego. Nie znalazłam informacji czy korzystano z dostępnych programów komputerowych do przewidywania struktury drugorzędowej RNA. Prosiłabym o uzupełnienie na obronie tej informacji. Czy została zbadana również struktura drugorzędowa fragmentów RNA zastosowanych mutantów (Mut1, Mut2, Mut3)?

Kolejna publikacja: ***Mechanistic determinants of MBNL activity*** również została opublikowana w *Nucleic Acids Research*. Publikacja jest bardzo rozbudowana (16 stron liczy artykuł, a 38 stron Supplementary Materials) i poruszająca wiele aspektów i konsekwencji

istnienia kilku genów MBNL. Pani mgr Taylor, jako trzeci współautor na dziewięciu, deklaruje, że jest autorem wszystkich badań *in vitro* ujętych w publikacji. Publikacja przedstawia badania paralogów MBNL1, MBNL2 i MBNL3 i oddziaływania MBNL z ich docelowymi cząsteczkami RNA oraz powtórzeniami CUG i CCUG. Doktorantka stosując szereg modelowych RNA oraz AON wykazała, że wszystkie badane białka wiążą się do sekwencji konsensusowych MBNL rozpoznając te same motywy w rejonie regulatorowym. MBNL3 wykazywał najmniejsze powinowactwo do docelowego RNA i najniższą dynamikę wiązania z (CUG)^{exp}. W połączeniu z innymi danymi wskazano sekwencje YGCH/HGCT (gdzie Y oznacza pirymidynę, H oznacza C, U lub A), jako sekwencję docelową wszystkich paralogów MBNL.

W publikacji *Oral administration of erythromycin decreases RNA toxicity in myotonic dystrophy* w *Annals of Clinical and Translational Neurology* mgr Taylor jest jednym z równorzędnych pierwszych autorów. Praca przedstawia badania zmierzające do opracowania nowej strategii terapeutycznej dla DM1 opierającej się na zastosowaniu erytromycyny. Wykazano, że erytromycyna bezpośrednio oddziałuje z powtórzeniami (CUG)₁₀ oraz inhibuje powstawanie kompleksów MBNL1 z (CUG)₁₀₀ w warunkach *in vitro*. Oprócz badań *in vitro* wiązania antybiotyków do modelowych RNA, doktorantka przeprowadziła eksperymenty z erytromycyną w modelach komórkowych DM. Wykazała znaczące zmniejszenie zarówno ilości, jak i wielkości jądrowych inkluzji tworzonych przez toksyczne kompleksy MBNL/(CUG)^{exp}. Co istotne, potwierdziła również specyficzność działania erytromycyny na patogenne RNA stosując analizę profili splicingowych alternatywnych eksonów. Mgr Taylor potwierdziła znaczną korektę alternatywnego splicingu kontrolowanego przez białka MBNL. Są to niezwykle ciekawe badania wykorzystujące znany antybiotyk do nowych terapeutycznych celów.

W publikacji przetestowano dwadzieścia *FDA-approved* molekuł. Proszę o wyjaśnienie, jakie było kryterium ich wyboru? Czy rozważano aspekt strukturalny tworzenia kompleksu EM/(CUG)^{exp}?

Publikacja *Short antisense-locked nucleic acids (all-LNAs) correct alternative splicing abnormalities in myotonic dystrophy* opublikowana w *Nucleic Acids Research* obejmuje badania modyfikowanych oligonukleotydów, jako potencjalnych inhibitorów tworzenia kompleksów MBNL/(CUG)^{exp}. Doktorantka wykonała wszystkie badania przeprowadzone *in*

vitro. Zastosowano oligonukleotydy typu LNA (usztywniona konformacja pierścienia rybozy, ang. *locked nucleic acids*) oraz PS-LNA (tiofosforan-LNA, ang. *phosphorothioate-LNA*). Badania wykazały, że krótkie, 8-, 10-nukleotydowe oligonukleotydy wydajnie wiążą się do modelowego RNA złożonego ze 100 powtórzeń CUG i równocześnie blokują powstawanie kompleksu z MBNL. Ten wynik znalazł swoje potwierdzenie w eksperymentach komórkowych, gdzie wykazano, że lepszym inhibitorem sekwestracji białek MBNL jest oligonukleotyd o długości 10 nukleotydów.

Interesuje mnie jak doktorantka wytłumaczyłaby wyższe powinowactwo oligonukleotydu PO-LNA-CAG-8 do (CUG)100, w porównaniu do dłuższych oligonukleotydów? Czy brano pod uwagę inną liczbę potencjalnych miejsc wiązań dla różnej długości oligonukleotydów? Mogłoby to wytłumaczyć mechanizm działania danego oligonukleotydu.

Istnieje obawa, że tak krótkie oligonukleotydy mogą wywoływać efekt *off-target*. Czy taki scenariusz był rozważany w szerszym kontekście, tzn. czy sprawdzono ewentualną cytotoksyczność oligonukleotydów?

Reasumując, przedstawione w rozprawie doktorskiej badania dostarczają nowych informacji o podłożu molekularnym dystrofii miotonicznej i inhibitorach patogennych mechanizmów tej choroby o dużym potencjale terapeutycznym. Pragnę stwierdzić, że przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Katarzyny Taylor spełnia całkowicie wymogi merytoryczne i formalne stawiane pracom doktorskim i wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Biologii, Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr Katarzyny Taylor do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Elżbieta Kierzek

dr hab. Elżbieta Kierzek, profesor IChB PAN