

Prof. dr hab. Jerzy Ciesiołka
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
ul. Noskowskiego 12/14
61-704 Poznań

Poznań, 27 listopada 2015 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Łukasza J. Sznajdera pt.: Udział białek MBNL w metabolizmie RNA

Rozprawa doktorska mgr Łukasza J. Sznajdera została wykonana pod kierunkiem dr hab. Krzysztofa Sobczaka, prof. UAM w Zakładzie Ekspresji Genów Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii Wydziału Biologii UAM w Poznaniu. Problematyka pracy dotyczy funkcji fizjologicznej trzech paralogów białek określanych jako *Muscleblind-like* (MBNL) oraz ich izoform splicingowych, a także poznania udziału tych białek w oddziaływaniach z toksycznymi transkryptami zawierającymi wydłużone powtórzenia CUG. Białka MBNL wiążą się do cząsteczek RNA i regulują ich metabolizm na różnych etapach funkcjonowania komórki, przy czym najintensywniej badano ich udział w regulacji alternatywnego splicingu. Okazało się ponadto, że oddziaływania białek MBNL z transkryptami z wydłużonymi powtórzeniami trójnukleotydowymi, charakterystycznymi dla dystrofii miotonicznej (DM), odgrywają kluczową rolę w patomechanizmie molekularnym tej choroby genetycznej. Podjęty temat jest zatem bardzo ważny zarówno dla poznania podstawowych procesów regulacji ekspresji genów na poziomie RNA, jak i badań biomedycznych, wyjaśnienia mechanizmu molekularnego dystrofii miotonicznej.

Cel pracy doktorskiej mgr Łukasza Sznajdera ujęty został w formie czterech zadań. Pierwszym zadaniem było przygotowanie wysoko-rozdzielczych całotranskryptomowych map oddziaływania RNA z paralogami MBNL, poprzez przeprowadzenie eksperymentów RIP-seq i CLIP-seq oraz przy wykorzystaniu danych z eksperymentów tego typu przeprowadzonych w innych laboratoriach. Otrzymane wyniki użyte zostały w zadaniu drugim do wyselekcjonowania zaburzenia alternatywnego splicingu genu *NASP*, które występuje u pacjentów z DM1, w celu określenia mechanizmu jego powstawania i wpływu na potencjał proliferacyjny komórek DM1. W zadaniu trzecim porównano aktywność trzech paralogów MBNL i ich izoform w regulacji alternatywnego splicingu. Czwartym, ostatnim realizowanym zadaniem było określenie udziału białek MBNL i ich izoform w agregowaniu transkryptów z wydłużonymi powtórzeniami trójnukleotydowymi CUG.

Wstęp literaturowy do rozprawy (16 stron) składa się z dwóch rozdziałów. W pierwszym z nich, mgr Łukasz Sznajder przedstawił aktualny stan wiedzy na temat białek z rodziny Muscblind-like, struktury i ekspresji kodujących je genów, budowy białek i sposobu wiązania do RNA, oraz funkcji różnych paralogów MBNL. W rozdziale drugim przedstawił podstawowe informacje na temat dystrofii miotonicznej typu 1 i 2 oraz patomechanizmu molekularnego tej choroby genetycznej, ze szczególnym uwzględnieniem akumulacji mRNA z wydłużonymi powtórzeniami trójnukleotydowymi zasocjowanych z białkami MBNL w agregatach jądrowych. Ostatni podrozdział tej części pracy poświęcony został wybranym przykładom zaburzeń alternatywnego splicingu powiązanych z symptomami DM1, których mechanizm związany jest z białkami MBNL. Przegląd literaturowy przygotowany został kompetentnie, z trafnym wyborem przede wszystkim tych informacji, które wiążą się z badaniami przedstawionymi w pracy doktorskiej. Przegląd ten uzupełniają krótkie podrozdziały zamieszczone w kolejnej części pracy doktorskiej *Wyniki*, które powiązane są z jej celami cząstkowymi i przedstawiają stan wiedzy dotyczący poszczególnych, rozwiązywanych problemów badawczych.

Zasadnicza część pracy doktorskiej *Wyniki* (64 strony) podzielona została na cztery części tematyczne, odpowiadające zadaniom wyszczególnionym w celu pracy. Jak wspomniano wcześniej, każda z tych części poprzedzona jest podrozdziałem z informacjami literaturowymi, a zawiera także sformułowany problem badawczy i cel podjętych badań. Poszczególne części zakończone są podrozdziałami zatytułowanymi *Podsumowanie i perspektywy*, w których podkreślono najważniejsze obserwacje i ustalenia kolejnych etapów badań. Przyjęta organizacja tekstu zwiększa przejrzystość opisu prowadzonych prac, przy czym Autor umiejętnie ustrzegł się powtarzania tych informacji w rozdziale końcowym – *Dyskusji* (6 stron).

W części pierwszej mgr Łukasz Sznajder zastosował metody RIP-seq i CLIP-seq do stworzenia map oddziaływania MBNL1 z transkryptomem. Ponieważ w międzyczasie opublikowane zostały dane CLIP-seq dla paralogów MBNL2 i MBNL3 oraz niektórych innych czynników splicingowych, również te dane Autor wykorzystał do stworzenia unikalnej, internetowej bazy danych nazwanej MIB (*MBNL Interacome Browser*), we współpracy z grupą prof. Izabeli Makałowskiej z macierzystego Instytutu. Bazę tę można wykorzystywać w badaniach oddziaływań białek MBNL i wybranych czynników splicingowych z RNA, a jej stworzenie stanowi znaczące osiągnięcie pracy doktorskiej. Przy lekturze dalszej części pracy pojawia się pytanie, na które chciałbym uzyskać odpowiedź

podczas jej publicznej obrony. Na stronie 71, opisując detekcję miejsc fotozszywania białka MBNL1 do RNA z wykorzystaniem odwrotnej transkryptazy, Autor zauważa, że wśród tzw. mutacji wywoływanych fotozszywaniem, najpowszechniej obserwowana jest zamiana cytozyny na tyminę. Z drugiej strony, wiadomo, że wśród szeregu typów uszkodzeń kwasów nukleinowych poddawanych naświetlaniu światłem ultrafioletowym, do najczęstszych należy hydrolityczna deaminacja reszt cytozyny. Czy efekt ten, zdaniem Autora, mógłby wpływać na wyniki analizy miejsc fotozszywania białka do RNA metodą odwrotnej transkrypcji?

Realizację kolejnej części pracy Autor rozpoczął od analizy bioinformatycznej mającej na celu wyselekcjonowanie procesu biologicznego regulowanego przez paralogi białek MBNL, który mógłby posłużyć w dalszych, szczegółowych badaniach eksperymentalnych roli tych białek w komórce. Wytypował transkrypt genu *NASP*, który koduje białko uczestniczące w procesie replikacji DNA, transporcie i przechowywaniu histonów i jest ważne dla prawidłowego przebiegu cyklu komórkowego, proliferacji, wzrostu i różnicowania komórek. Białko to może występować w co najmniej dwóch izoformach splicingowych, wykazuje podwyższony poziom ekspresji w DM1 i DM2, zatem gen *NASP* stanowił bardzo atrakcyjny model badawczy. Autor zaplanował i przeprowadził serię eleganckich doświadczeń, w których wykazał, że w DM1 dochodzi do zwiększonego włączania alternatywnego egzonu t mRNA *NASP*, a proces ten regulowany jest przez paralogi MBNL. Białka te oddziałują z 9-nukleotydowym fragmentem intronu 6. W tej części pracy, w celu potwierdzenia, że MBNL1 wiąże się do określonych regionów RNA, Autor zsyntetyzował modelowe cząsteczki RNA i badał efektywność wiązania MBNL1 w obecności oligonukleotydów antysensowych maskujących potencjalne miejsca wiązania białka. Jednakże, zarówno podczas planowania miejsc wiązania oligonukleotydów antysensowych jak i przy opisie efektów ich działania uwzględniona została jedynie struktura pierwszorzędowa docelowych RNA. Czy podjęta została próba interpretacji wyników tych doświadczeń, która uwzględniałaby strukturę drugorzędową badanych RNA oraz potencjalnie różną dostępność do hybrydyzacji komplementarnych oligonukleotydów różnych regionów cząsteczek docelowych?

W kolejnej części pracy mgr Łukasz Sznajder opisuje rezultaty porównania aktywności splicingowej trzech paralogów MBNL oraz ich wybranych izoform. Do tego celu skonstruował 10 wektorów kodujących najpowszechniejsze warianty tych białek. Postanowił określić ich wpływ na regulację kilkudziesięciu zjawisk alternatywnego splicingu, prowadząc badania w komórkach HeLa. Skoncentrował się przy tym nie tylko na porównaniu aktywności badanych białek, ale także określeniu ich cech determinujących zaobserwowane różnice, w

tym powinowactwa do docelowych sekwencji RNA oraz dystrybucji komórkowej porównywanych białek. Na wybranych przykładach wykazał, że wszystkie badane izoformy MBNL jednakowo regulują kierunek zmiany zjawiska alternatywnego splicingu, włączenie lub wyłączenie odpowiedniego egzonu w transkrypcie, przy czym efekt jest relatywnie silniejszy w przypadku wyłączania alternatywnego egzonu. Zarówno dla endogennych jak i egzogennych transkryptów, wyniki wskazują, że izoformy MBNL1 cechują się najwyższą aktywnością splicingową, a izoformy MBNL3 aktywnością najniższą. Różnice te zależą od powinowactwa białek MBNL do docelowych sekwencji RNA oraz stężenia białka w jądrze komórkowym.

W ostatniej części pracy mgr Łukasz Sznajder opisuje wyniki badań udziału białek MBNL w agregowaniu transkryptów z wydłużonymi powtórzeniami trójnukleotydowymi CUG. Stosując odpowiednio skonstruowane modelowe RNA oraz testy *in vitro*, wykazał, że paralogi MBNL wiążą się z większym powinowactwem, od kilku do kilkuset razy, do transkryptów z powtórzeniami niż do sekwencji zaangażowanych w regulację alternatywnego splicingu. Następnie skonstruował układ modelowy z wykorzystaniem komórek HeLa transfekowanych wektorami kodującymi docelowe RNA z wydłużonymi powtórzeniami CUG, a także paralogi MBNL skonjugowane z białkiem GFP. Analiza w mikroskopie konfokalnym wskazała, że transkrypty indukują agregację MBNL przez multimeryzację lub skupienie białek, będącą wynikiem ich oddziaływania z transkryptem niosącym trójnukleotydowe powtórzenia. Utworzone agregaty są strukturami dynamicznymi, a wyniki sugerują, że białka MBNL nie są trwale z nimi związane.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Łukasza Sznajdera napisana jest w sposób czytelny, poprawnym językiem i w jasny sposób przedstawia zarówno informacje literaturowe jak i wyniki prac własnych. Na szczególne podkreślenie zasługuje jej bardzo bogata część ilustracyjna, ze szczegółowymi podpisami pod rysunkami. Znakomicie ułatwia to czytelnikowi śledzenie postępu prac oraz wyników kolejnych eksperymentów, a w szczególności, tych bardzo zaawansowanych metodycznie. Autor nie ustrzegł się jednak kilku błędów redakcyjnych, stylistycznych oraz drobnych pomyłek, a kilka z nich przytaczam poniżej: 1/ w spisie literatury, w przypadku cytowania prac mających więcej niż 3 współautorów podany jest wyłącznie pierwszy z nich; ten sposób cytowania, aczkolwiek poprawny formalnie, utrudnia czytelnikowi zorientowanie się, z jakiego laboratorium cytowana informacja pochodzi, bowiem większość umieszczonych w spisie prac ma więcej niż 3 współautorów, a autor do korespondencji jest zazwyczaj umieszczany na końcu, 2/ w tekście pracy zbędne jest wielokrotne powtarzanie angielsko-języcznych tłumaczeń

niektórych terminów, 3/ skrót MBNL pisany jest nie tylko normalną i pochyłą czcionką (rozróżnienie to jest powszechnie stosowane w literaturze), ale także z dużą pierwszą i następnymi małymi literami, przy czym nie sędzę, aby dobrym wyjaśnieniem było ujęcie tych oznaczeń w wykazie skrótów, jako stosowanych zamiennie.

Zauważone, drobne usterki nie wpływają w istotny sposób na moją wysoką ocenę przedstawionej do recenzji rozprawy. Opisane w niej wyniki uważam za bardzo istotne dla poznania funkcji trzech paralogów MBNL w regulacji zjawiska alternatywnego splicingu, a także roli tych białek w formowaniu agregatów z toksycznymi transkryptami z wydłużonymi powtórzeniami trójnukleotydowymi typu CUG. Badania prowadzone były według standardów obowiązujących w najlepszych laboratoriach pracujących w podobnej tematyce, a otrzymane wyniki świadczą o opanowaniu przez Autora trudnego warsztatu badawczego. W toku realizacji pracy doktorskiej stworzona została wysoko-rozdzielcza baza oddziaływań paralogów MBNL z transkryptem, dostępna w postaci serwisu internetowego, która służy już innym badaczom. Jestem przekonany, że przeprowadzone badania zaowocują również wkrótce bardzo dobrymi publikacjami naukowymi.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona rozprawa odpowiada w pełni wymogom stawianym pracom doktorskim i wnoszę do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr Łukasza J. Sznajdera do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

