

Recenzja pracy doktorskiej mgr Arkadiusza Kajdasza pt:

***Potranskrypcyjna regulacja ekspresji genu CELF1-
wpływ na patomechanizm dystrofii miotonicznej***

Praca doktorska mgr Arkadiusza Kajdasza powstała w Zakładzie Ekspresji Genów, na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza, a kierowanym przez prof. UAM dr hab. Krzysztofa Sobczaka. Promotor pracy doktorskiej od wielu lat zajmuje się różnymi aspektami badań związanych z dystrofią miotoniczną. Badania naukowe, jakie prowadził mgr Kajdasz, wpisują się w nurt badań prowadzonych przez grupę badawczą profesora Sobczaka.

Praca doktorska posiada klasyczny układ i składa się z wszystkich części wymaganych w tego typu rozprawach. W części literaturowej kandydat zawarł informacje o dystrofii miotonicznej, zaczynając od najważniejszych ogólnych wiadomości na ten temat i dalej skupiając się na uznawanym obecnie patomechanizmie tej choroby. Zawarte są w niej szczegółowe informacje o podstawach molekularnych dystrofii miotonicznej, rodzajach choroby i jej objawach. Niezwykle użyteczne są przejrzyste schematy, które ułatwiają przyswojenie wiedzy o kluczowych zaburzeniach genetycznych związanych z występowaniem dystrofii miotonicznej, o powstawaniu patogennego RNA wynikającego z powtórzeń CUG w przypadku dystrofii miotonicznej typu 1 (DM1) i CCUG dla dystrofii miotonicznej typu 2 (DM2), co w obu przypadkach przekłada się na szereg nieprawidłowych oddziaływań odpowiednich RNA. Doktorant wyjaśnia poznane dotychczas mechanizmy chorobotwórcze i zwraca uwagę na zagadnienia do tej pory nierozpatrywane, a mogące brać udział w pojawieniu się objawów chorobowych. W związku z tym duża część rozdziału literaturowego dotyczy charakterystyk białek CELF, zaburzenia ich funkcji w dystrofii miotonicznej i naprowadza czytelnika na pytania oraz cele jakie kandydat sformułował podejmując się badań. Białka CELF są drugą grupą białek, poza MBNL, których zaburzenie (wzrost aktywności) potwierdzono w dystrofii miotonicznej typu 1, ale już nie w przypadku dystrofii miotonicznej typu 2. CELF1 kontroluje proces splicingu, odpowiada za destabilizację mRNA i miRNA oraz aktywację translacji białek związanych z rozwojem

mięśni prążkowanych. Oddzielny rozdział części literaturowej stanowi omówienie potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów z udziałem regionów UTR. Tutaj także doktorant zwrócił główną uwagę na rolę białek MBNL i CELF w tym procesie. Obszerny fragment części literaturowej kandydat poświęcił na opis dotychczasowej wiedzy na temat przyczyn zmian poziomu lub aktywności białek CELF, które są powiązane z dystrofią miotoniczną.

Z danych literaturowych wynika, że w dystrofii miotonicznej fragmenty 5'UTR i 3'UTR *CELF1* - przy niezaburzonej części mRNA kodującej białko - mogą występować na zmienionym poziomie. Nieprawidłowa aktywność CELF1 w dystrofii miotonicznej może być więc skutkiem zmian w UTR, które są kluczowe dla translacji tego białka. Wychodząc z tej obserwacji doktorant sformułował jeden z głównych celów swojej pracy doktorskiej. Było nim określenie mechanizmów prowadzących do potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genu *CELF1* związanej z powstawaniem alternatywnych wariantów 5'UTR i 3'UTR oraz próba określenia związku tej regulacji z patomechanizmem dystrofii miotonicznej. Chcąc to osiągnąć mgr Kajdasz wyznaczył sobie szereg celów i zadań pośrednich. Wśród tych zadań było określenie przyczyn zaburzeń splicingu regionów UTR *CELF1* w mięśniach szkieletowych pacjentów z dystrofią miotoniczną typu 1 oraz określenie profili splicingowych UTR *CELF1* w tkankach człowieka. Kandydat wykazał zmiany tych profili w mięśniach szkieletowych człowieka podczas ich rozwoju oraz różnice tych profili pomiędzy innymi typami tkanek (serce i mózg). Natomiast w modelu mysim dystrofii miotonicznej typu 1 nie potwierdzono zaburzeń splicingu 5'UTR i 3'UTR *CELF1*, co kandydat tłumaczy specyfiką modelu HSA^{LR}, a mianowicie zmianą położenia genu z ekspansją CUG z 3'UTR *DMPK* na 3'UTR ludzkiej aktyny. Szkoda, że kandydat nie pokusił się o głębszą dyskusję tej obserwacji w swojej rozprawie doktorskiej.

Kandydat spodziewał się zmiany aktywności translacyjnej 5'UTR *CELF1* w mięśniach szkieletowych. Wyniki badań wskazały jednak, że długość 5'UTR *CELF1* oraz eksony odróżniające izoformy 5'UTR *CELF1* nie mają istotnego wpływu na zdolność translacyjną *CELF1* i nie powodują zwiększenia poziomu tego białka w dystrofii miotonicznej typu 1. Po serii kolejnych eksperymentów komórkowych stwierdził również, że białka MBNL1 i CELF1 nie wpływają bezpośrednio na translację *CELF1*. Mgr Kajdasz przyjrzał się również potencjalnemu wpływowi różnych sekwencji fragmentów RNA otaczających dwa kodony AUG w mRNA *CELF1*. Nie zauważył jednak ich wpływu na wydajność inicjacji translacji. Zgłębiając dalej ten problem kandydat stwierdził, że obie izoformy białkowe CELF1 mają różną aktywność splicingową. Krótsze białko wykazuje wyższą wydajność w stosunku do niektórych eksonów, co w połączeniu z poprzedzającymi badaniami sugeruje, że zmiany na poziomie białka są przyczyną obserwowanych zaburzeń (nieprawidłowego wzrostu aktywności CELF1).

Mgr Kajdasz zbadał również potencjalny wpływ 3'UTR *CELF1* na wydajność translacji. Skupił się na badaniu zmian poziomu izoform 3'UTR *CELF1*, przekładających się na poziom izoform białka *CELF1*. Po przeanalizowaniu danych literaturowych na ten temat oraz wyników własnych doszedł do wniosku, że długość izoform 3'UTR *CELF1* jest regulowana przez alternatywny splicing i alternatywną poliadenylację. Poziomy izoform zależą także od typu tkanek. Wyniki sugerują, że wydajna regulacja ilości poszczególnych izoform może wpływać na ekspresję *CELF1*, prawdopodobnie poprzez odmienne wiązanie specyficznych białek czy miRNA. Oddzielny rozdział stanowią badania potencjalnego wpływu miRNA na ekspresję *CELF1*, wynikającą z różnic w sekwencjach docelowych dla miRNA w poszczególnych izoformach 3'UTR *CELF1*.

Kandydat spróbował również określić lokalizację komórkową 5'UTR i 3'UTR *CELF1* i nie znalazł istotnych różnic w dystrybucji izoform. Doktorant podczas tych badań napotkał jednak na trudności metodyczne i zapewne warto byłoby te eksperymenty powtórzyć. Interesujące za to wyniki otrzymał prowadząc badania wydajności alternatywnego splicingu eksonów zależnych wyłącznie od *CELF1* i pokazując zaburzenie zarówno w dystrofii miotonicznej typu 1, jaki i typu 2. Taką nieprawidłowość mgr Kajdasz pokazał po raz pierwszy dla dystrofii miotonicznej typu 2 w mięśniach szkieletowych. Kandydat podkreśla, że zaburzenie splicingu eksonu 17 *ITGB1*, występuje wyłącznie w mięśniach szkieletowych z dystrofią miotoniczną typu 2, a nie typu 1.

Każdy krok badawczy mgr Kajdasza był przemyślany, poprzedzony analizą dostępnych danych, czy to literaturowych, czy też zdeponowanych w bazach danych. Taka analiza doprowadzała do interesujących wniosków, jasno pokazuje tok myślenia kandydata i oprócz oryginalnych wyników jest cennym wkładem w ogólną wiedzę na temat dystrofii miotonicznej. W wykonywanych badaniach wyraźnie widać dojrzałość naukową kandydata, umiejętność wyciągania wniosków i konsekwencje w ich prowadzeniu.

Najciekawszą częścią rozprawy doktorskiej jest dyskusja wyników. Ta część pracy doktorskiej napisana jest wyjątkowo spójnie i prezentuje wyniki badań kandydata na tle do tej pory zgromadzonych. Ogólnym wnioskiem recenzowanej pracy doktorskiej jest wykazanie, że alternatywny splicing eksonu AUG1 *CELF1* zależy od MBNL. Wpływa to na obecność tej izoformy białka *CELF1* i jego aktywność podczas procesu patogenezy. W warunkach niedoboru MBNL wyłączany jest ekson AUG1 *CELF1* z dojrzałego mRNA oraz obniża się poziom dłuższej izoformy *CELF1*. Takie dłuższe białko ma w niektórych przypadkach niższą aktywność. Wykazano, że w mięśniach szkieletowych człowieka z dystrofią miotoniczną dochodzi do podwyższenia aktywności *CELF1*, nie tylko w wyniku stabilizującej hiperfosforylacji, ale także poprzez regulację alternatywnego splicingu 5'UTR *CELF1* powodującej ekspresję aktywniejszej formy białka. Potwierdzono obecność izoform białka i konsekwencje funkcjonalne ich występowania. Zauważalne zmiany w poziomie izoform 3'UTR w mięśniach szkieletowych prowadzące do zmniejszenia poziomu

izoformy *a* i zwiększenia izoform *c* i *d* jest ważnym spostrzeżeniem wartym przeprowadzenia dalszych, bardziej szczegółowych badań. Na poziom izoform 3'UTR *CELF1* wpływa zarówno zmiana aktywności białek MBNL, jak i CELF.

Kandydat stwierdza, że CELF1 przez wpływ na patomechanizm dystrofii miotonicznej może być celem terapeutycznym. Zauważa, że terapie regulujące proces splicingu regionów UTR będą szczególnie cenne w leczeniu dystrofii miotonicznej typu 2, gdzie nie obserwuje się zwiększenia aktywności związanej z hiperfosforylacją. Doktorant słusznie jednak podkreśla, że taka terapia nie wykluczy wszystkich uwarunkowań chorobowych, gdyż dotyczy tylko jednej zaburzonej ścieżki ekspresji genów. Prawdziwą skuteczność tego podejścia można byłoby uzyskać w skorelowaniu z innymi terapiami bezpośrednio związanymi z powstaniem dystrofii. Praca doktorska wnosi duży wkład w poznanie mechanizmów patologicznych i kaskady nieprawidłowych procesów biologicznych w dystrofii miotonicznej.

Praca doktorska napisana jest poprawnie i sposób bardzo zwięzły prezentuje wyniki i wnioski z przeprowadzonych badań. Nowy obszar badań patomechanizmu dystrofii miotonicznej wymagał realizacji kilku celów pośrednich, które w sposób logiczny naprowadzały kandydata na sprawdzanie kolejnych hipotez. Siłą rzeczy wnioski z tak szeroko prowadzonych badań są czasem jedynie jakościowe a nie ilościowe. Niekiedy mam wrażenie, że kandydat był zbyt ostrożny formułując niezwykle ogólne wnioski, w sytuacji, gdy miał w ręku bardzo interesujące wyniki eksperymentalne.

Mgr Kajdasz zastosował w swych badaniach urozmaicony i nowoczesny warsztat badawczy. Przemysłany dobór metod pozwolił mu wyciągnąć odpowiednie wnioski i realizować kolejne etapy badań. Swoje eksperymenty wykonywał na tkankach, linach komórkowych i pewien fragment badań również na modelu mysim - a więc eksperymenty trudne, wymagające umiejętności i wielokrotnych powtórzeń. Recenzent docenia duży wkład pracy w uzyskanie tak wielu wartościowych wyników. Jednocześnie, jako osoba zajmująca się RNA, w szczególności strukturą RNA i jej korelacji z funkcją biologiczną, zastanawiam się, dlaczego badając zmiany w UTR i alternatywnym splicingu kandydat nie pokusił się na rozważenie potencjalnych zmian w strukturze UTR i ewentualne powiązał je z własnymi obserwacjami eksperymentalnymi. Oczekuję, że kandydat rozwinie ten temat, chociaż w pewnym zakresie, podczas obrony pracy doktorskiej.

Pracę doktorską czyta się z zainteresowaniem, napisana jest w większości ładnym i prawidłowym językiem. Kandydat nie uchronił się od kilku błędów nomenklaturowych, które czuję się w obowiązku wymienić. Na str. 66 kandydat zamiast prawidłowej nazwy guanozyna czy reszta guanozyny, używa "*guanidyna*" i dalej "*adenina*" zamiast adenozyne. Powszechnym błędem jest skrótowe, nieprawidłowe używanie określenia "*sekwencja*", na przykład, na tej samej stronie doktorant napisał "*zostały wstawione sekwencje długości 100 nukleotydów*". Tymczasem w przypadku kwasów nukleinowych sekwencja to kolejność ułożenia czterech rodzajów reszt nukleotydowych w

oligonukleotydzie, polinukleotydzie czy dłuższym fragmencie DNA czy RNA. Nagminnie kandydat używa bardzo nieprecyzyjnych i ogólnych określeń takich jak "jakość białka" czy "jakość sekwencji", zamiast białko używa często wyrażenie "czynnik". Największym mankamentem dla recenzenta, znacznie umniejszającym przyjemność czytania pracy doktorskiej, są małe, czasem wręcz miniaturowe rysunki. Mimo ich wysokiej rozdzielczości trudno je analizować, często też brakuje szerszego opisu przedstawionych na tych rysunkach eksperymentów. Dyskusji uzyskanych wyników badań nie ułatwia rozdział *Materiały i Metody*, w którym kandydat ograniczył się jedynie do najważniejszych informacji i mimo dużej ilości różnych eksperymentów ten rozdział jest dość skromny. Czasem brakuje informacji o liczbie powtórzeń danego eksperymentu, co w badaniach na komórkach jest szczególnie istotne.

Pomimo przedstawionych powyżej uwag – co jest w obowiązku recenzenta – pracę doktorską mgr Arkadiusza Kajdasza oceniam wysoko. Przeprowadzone badania weryfikujące w sposób kompleksowy hipotezy badawcze pozwoliły osiągnąć cel pracy: potwierdzenie i wyjaśnienie roli potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genu *CELF1* w kumulacji objawów dystrofii miotonicznej. Praca poszerza i uzupełnia podstawową wiedzę o patomechanizmie tej choroby, stanowi też podstawę do dalszych bardziej szczegółowych badań oraz wykorzystania w terapii. Interesująca jest perspektywa celowanej terapii genowej uwzględniającej obniżenie aktywności *CELF1*, szczególnie w dystrofii miotonicznej typu 2. Należy sobie jednak zdawać sprawę, że patologiczna aktywność *CELF1* jest drugorzędowym skutkiem podstawowego zaburzenia genetycznego dystrofii miotonicznej.

Reasumując, uważam, że jest to ciekawa i wartościowa praca doktorska, zrealizowana na wysokim poziomie, która wnosi dużo informacji o podłożu molekularnym dystrofii miotonicznej. Pragnę stwierdzić, że przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Arkadiusza Kajdasza 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 Arkadiusza Kajdasza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Elżbieta Kierzek

Dr hab. Elżbieta Kierzek, prof. IChB PAN