

2017-05-05



Recenzja

Rozprawy Doktorskiej pani mgr Katarzyny Taylor

Pt.: „The RNA/MBNL interactions: structural basis, potential inhibitors and functional implications”

wykonanej pod kierunkiem pana dr hab. Krzysztofa Sobczaka

W Zakładzie Ekspresji Genów Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii, na
Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Wydział Biochemii, Biofizyki i
Biotechnologii

Uniwersytet Jagielloński

Zakład Biochemii Ogólnej

Prof. dr hab. Jolanta Jura

Przedmiotem badań ujętych w rozprawie doktorskiej pani mgr Katarzyny Taylor jest mechanizm regulacji alternatywnego składania transkryptów, w który zaangażowane jest białko MBNL (ang. Muscleblind-like). Proces alternatywnego składania transkryptów jest jedną z form regulacji ekspresji genów, dzięki któremu znacząco zwiększa się ostateczna i funkcjonalna liczba białek w porównaniu do liczby kodujących je genów. Białko MBNL pełni w komórce różne funkcje, związane z metabolizmem RNA. Między innymi odpowiada za subkomórkową lokalizację cząsteczek mRNA i ich stabilność oraz za aktywację alternatywnych miejsc składania i poliadenylacji. W swojej pracy Doktorantka skupiła się na badaniu mechanizmu alternatywnego składania RNA. W szczególności, skupiła się na wyjaśnieniu mechanizmu włączania i wyłączania alternatywnych eksonów, a miejscem wiązania się białka MBNL. Regulacja procesu alternatywnego składania została zbadana w warunkach fizjologicznych oraz patologicznych, tzn. w przypadku dojrzewania transkryptu zawierającego zmianę patogenną, mającą charakter mutacji dynamicznej.

Tematyka badawcza ma bardzo ważne znaczenie z kilku względów. Po pierwsze, przeprowadzone badania i uzyskane wyniki poszerzają ogólną wiedzę o podstawowych procesach molekularnych zachodzących na poziomie komórkowym. Po drugie, dotyczą ważnego aspektu regulacji ekspresji genów, a w szczególności alternatywnego składania transkryptów – zagadnienia już dobrze poznanego ale nadal wymagającego wyjaśnienia niektórych aspektów tego procesu. Po trzecie, badania Doktorantki i Zespołu, w którym Doktorantka wykonywała te badania mają potencjał terapeutyczny i stanowią podstawę do opracowywania substancji terapeutycznych w leczeniu miotonii, która jest cechą charakterystyczną w dysfunkcji mięśni szkieletowych pacjentów z dystrofią miotoniczną.

Adres:

Gronostajowa 7

30-387 Kraków

tel. +48(12) 664 63 59

fax +48(12) 664 69 02

email: jolanta.jura@uj.edu.pl

Formalny opis rozprawy

Głównym elementem rozprawy jest spójny tematycznie zbiór czterech, wieloautorskich publikacji. W dwóch z nich Doktorantka jest trzecim autorem, w jednej jest drugim, natomiast w ostatniej z nich jest autorem drugim ale mającym

równoważny wkład z autorem pierwszym. Prace zostały opublikowane w bardzo dobrych, recenzowanych periodykach zagranicznych, posiadających wysoki indeks oddziaływania. Są to następujące prace:

1. Konieczny P, Stepniak-Konieczna E, **Taylor K**, Sznajder ŁJ, Sobczak K. 2016. *Autoregulation of MBNL1 function by exon 1 exclusion from MBNL1 transcript*. *Nucleic Acids Res.* 45: 1760-1775.
2. Sznajder ŁJ, Michalak M, **Taylor K**, Cywoniuk P, Kabza M, Wojtkowiak-Szlachcic A, Matłoka M, Konieczny P, Sobczak K. 2016. *Mechanistic determinant of MBNL activity*. *Nucleic Acids Res.* 44: 10326-10342.
3. Nakamori M*, **Taylor K***, Mochizuki H, Sobczak K, Takahashi MP. 2015. *Oral administration of erythromycin decreases RNA toxicity in myotonic dystrophy*. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 3: 42-54. *wkład współautorów jest równoważny
4. Wojtkowiak-Szlachcic A., **Taylor K.**, Stepniak-Konieczna E., Sznajder ŁJ., Mykowska A., Sroka J., Thornton C.A. and Sobczak K. 2015. *Short antisense-locked nucleic acids (all-LNAs) correct alternative splicing abnormalities in myotonic dystrophy*. *Nucleic Acids Res.* 43: 3318-3331.

Praca doktorska zaczyna się spisem treści po czym zamieszczone jest 2,5 stronicowe streszczenie, napisane zgodnie z wymogami w j. polskim i j. angielskim. Następnie zamieszczone są oświadczenia współautorów 4 publikacji. W ramach opisu wykonanych badań zamieszczone zostały wyżej wymienione publikacje wraz z materiałami uzupełniającymi.

Ocena merytoryczna pracy

Jako cel pracy Doktorantka postanowiła określić strukturalne podstawy oddziaływania białek MBNL z docelowymi fragmentami RNA jak i poszukać inhibitorów tworzenia patogennych kompleksów MBNL/(CUG)^{exp} oraz zbadać funkcjonalne następstwa ich działania w modelowych komórkach manifestujących cechy dystrofii miotonicznej typu I (DM1).

Rodzina białek MBNL reprezentowana jest przez 3 paralogi: MBNL1, MBNL2 i MBNL3. Dodatkowo transkrypty kodujące e białka ulegają alternatywnemu składaniu, co prowadzi do powstania izoform białek, charakterystycznych dla zróżnicowanych tkanek. Białka te wiążą się z RNA rozpoznając motyw konserwatywny 5'-YGCY-3'. Wiązanie białek MBNL do transkryptów jest prawdopodobnie uwarunkowane także odpowiednią strukturą regionów, w których występują motywy konserwatywne.

Rola białka MBNL1 w regulacji alternatywnego składania opisana jest w publikacji nr 1 i 2. Zgodnie z przedstawionymi oświadczeniami dotyczącymi wkładu poszczególnych autorów udział pani mgr Katarzyny Taylor w przygotowanie publikacji pt.: „**Autoregulation of MBNL1 function by exon 1 exclusion from MBNL1 transcript**” polegał na: analizie *in vitro*, w tym przygotowaniu znakowanych transkryptów MBNL1, chemicznej i enzymatycznej analizie struktury MBNL1e1 zamieszczonej na Ryc. 1C publikacji, analizie wiązania dzięki oraz zmutowanych form fragmentów RNA do białka MBNL1, a także na przygotowaniu

rekombinowanego białka GST-MBNL1-His. Doktorantka uczestniczyła również w przygotowaniu opisu części *Materiałów i Metod*.

Doświadczenia przeprowadzone przez Doktorantkę pozwoliły na zdefiniowaniu cech strukturalnych nowego elementu regulatorowego, zlokalizowanego w regionie 5' eksonu 1 w transkrypcie genu *Mbnl1*. Wyodrębniono 9 konserwatywnych motywów YGCY w transkrypcie *MBNL1* w komórkach mysich i ludzkich. Stosując antysensowne nukleotydy Doktorantka wyznaczyła 20-nukleotydowy region w mRNA *MBNL1*, istotny dla wiązania się białka *MBNL1*. Poza sekwencjami konserwatywnymi region ten charakteryzuje się kilkoma pętlami wewnętrznymi i niską stabilnością termodynamiczną. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę stanowią składową pracy naukowej opublikowanej w *Nucl. Acids Res.* i przyczyniły się do zrozumienia wpływu białka *MBNL1* na regulację własnego transkryptu. Bardzo ważnym odkryciem jest pokazanie, jak poziom *MBNL1* wpływa na włączenie eksonu 1 do jego własnego transkryptu, a w konsekwencji, jak takie alternatywne składanie wpływa na jego wykorzystanie w procesie translacji, a potem w aktywności i stabilności białka. Publikacja ta zawiera bardzo dużo wartościowych wyników zaprezentowanych na 8 złożonych rycinach, 10 rycinach pomocniczych i 4 tabelach. Brakuje mi w tej pracy albo w skrótowym opisie rozprawy doktorskiej dywagacji, dlaczego np. w mózgu nie ma w ogóle formy wykorzystującej miejsce transkrypcji T1.

W publikacji zatytułowanej: „*Mechanistic determinants of MBNL activity*” opublikowanej również w *Nucl. Acids Res.*, w której Doktorantka jest trzecią w kolejności autorką, zbadano różnice w aktywności składania transkryptów przez paralogi *MBNL* (*MBNL1*, 2 i 3) oraz ich udział w tworzeniu inkluzji jądrowych na powtórzeniach motywów trójnukleotydowych i czteronukleotydowych w RNA. Zbadano lokalizację subkomórkową badanych białek, lokalizację miejsc wiązania tych białek do transkryptów, powinowactwo do miejsc regulatorowych badanych transkryptów oraz sprawdzono, czy alternatywnie składane eksony kodują sekwencje aminokwasowe. Analogicznie do pierwszej publikacji Doktorantka wykonała analizy *in vitro*, w tym transkrypcję *in vitro*, znakowanie transkryptów RNA oraz ich form zmutowanych, zbadła wiązanie paralogów *MBNL* do uzyskanych fragmentów RNA oraz zastosowała antysensowne oligonukleotydy w celu zahamowania wiązania białek *MBNL* do matrycy RNA i zbadła efekty tego zahamowania. Ponadto, Doktorantka przygotowała wersję roboczą dwóch podrozdziałów w *Wynikach* publikacji oraz dwóch podrozdziałów *Materiałów i Metod*. W ramach tej pracy wyniki przedstawiono na 9 złożonych rycinach oraz dodatkowo na 11 rycinach uzupełniających, dwóch tabelach uzupełniających i 4 filmach.

Zarówno praca omawiana jako pierwsza oraz powyższa publikacja stanowią spójną, logiczną całość. Publikacje są recenzowane przez specjalistów i trudno doszukiwać się niedociągnięć. Z pewnością należy podkreślić bardzo analityczne rozwiązanie problemu badawczego, wagę uzyskanych wyników oraz dokładność w ich prezentacji.

Pozostałe dwie publikacje związane są z poszukiwaniem aktywnych związków, które mogą ograniczyć sekwestrację białek *MBNL* do regionów, w których dochodzi do patogenicznej ekspansji powtórzeń mikrosatelitarnych. Jako model wykorzystano

komercyjnie dostępne linie komórkowe fibroblastów pochodzące od pacjentów z dystrofią miotoniczną oraz od osób zdrowych, a także modele zwierzęce.

W publikacji zatytułowanej: „**Oral administration of erythromycin decreases RNA toxicity in myotonic dystrophy**”, w której Doktorantka jest drugim autorem na równoważnej pozycji z pierwszym oraz przygotowanej we współpracy z grupą z Uniwersytetu w Osace, celem było zidentyfikowanie niskocząsteczkowych związków, które hamują wiązanie białek MBNL do RNA z ekspansją powtórzeń (CUG)_n. Z antybiotyków zaakceptowanych na rynku farmaceutycznym i wykazujących powinowactwo do rRNA przetestowano 20 związków, celem identyfikacji najbardziej efektywnego w obniżaniu skutków obecności w komórce toksycznych matryc RNA. W wyżej wymienionej publikacji Doktorantka zbadała oddziaływanie białka MBNL1 z RNA(CUG)^{exp} stosując metodę EMSA, wykonała pomiary wiązania antybiotyków do RNA z ekspansją motywów powtórzeniowych (wyniki zamieszczone na rycinie 1 A-C), wykonała analizę FISH, żeby oznaczyć ilość i wielkość inkluzji jądrowych oraz zanalizowała wzór alternatywnego składania w fibroblastach z ekspansją (CUG)_n traktowanych erytromycyną. Wyniki tych eksperymentów zostały zamieszczone na rycinie 3A-C. Zgodnie z oświadczeniem, Doktorantka uczestniczyła również w przygotowaniu niektórych części manuskryptu.

Stosując metody biochemii fizycznej i biologii molekularnej Doktorantka wykazała, że erytromycyna i neomycyna, antybiotyki powszechnie stosowane w terapii antybakteryjnej okazały się najbardziej efektywnymi związkami w oddziaływaniu z motywami (CUG)_n oraz w zmniejszeniu ilości tworzenia się kompleksów MBNL1/(CUG)_n. Ze względu na neurotoksyczne właściwości neomycyny w dalszych badaniach stosowana była tylko erytromycyna.

W kwestiach merytorycznych, zastanowił mnie wynik przedstawiony na rycinie 1 A publikacji, pokazujący wyniki EMSA. Metoda ta polega na opóźnieniu migracji w żelu kompleksu DNA lub RNA z białkiem względem cząsteczek kontrolnych, będących tylko fragmentami DNA czy RNA. Rycina 1A jest dość nieczytelna i nie obserwuje się wyraźnego opóźnienia migracji tylko zwiększenie intensywności prążka, odpowiadającego wolnej frakcji fragmentu RNA. W związku z tym chciałabym, żeby Doktorantka ustosunkowała się do tego zagadnienia w czasie obrony pracy doktorskiej. Między innymi, interesuje mnie, czy były wykonane testy wykorzystujące użycie różnych ilości matryc RNA z białkiem MBNL1. Oczywiście będzie to tylko teoretyczna dywagacja, biorąc pod uwagę fakt, że praca jest opublikowana w recenzowanym periodyku zagranicznym.

Bardzo ciekawym osiągnięciem było wykazanie, że dwudniowe traktowanie erytromycyną komórek modelowych DM1 skutkuje korektą alternatywnego składania, co oznacza, że dochodzi do uwolnienia białek MBNL z kompleksów z patogennym RNA. Te badania zostały potwierdzone na modelu mysim przez innych współautorów tej publikacji.

W pracy pt: „**Short antisense-locked nucleic acids (all-LNAs) correct alternative splicing abnormalities in myotonic dystrophy**” opisana została również strategia terapeutyczna ale oparta o zastosowanie chemicznie modyfikowanych antysensownych oligonukleotydów komplementarnych do powtórzeń (CUG)_n. Doktorantka jest w niej

wśród autorów na drugiej pozycji i zgodnie z przedstawionym oświadczeniem Jej wkład do powyższej publikacji obejmował wykonanie transkrypcji *in vitro*, znakowanie RNA, analizę EMSA, badanie wiązania MBLN1 z RNA i oczyszczanie białka rekombinowanego. Doktorantka uczestniczyła również w przygotowaniu roboczej wersji manuskryptu w częściach związanych z opisem eksperymentów, w które była bezpośrednio zaangażowana. W doświadczeniach prowadzonych *in vitro* Doktorantka sprawdzała jakie powinowactwo wykazują modyfikowane antysensowne oligonukleotydy do fragmentów RNA stanowiących 100 - krotne powtórzenie CUG oraz jak takie oligonukleotydy wpływają na tworzenie kompleksów MBLN1/RNA(CUG)100. Badania dostarczyły bardzo ciekawych obserwacji. Okazuje się, że długość oligonukleotydów ma zasadnicze znaczenie w ich powinowactwie do cząsteczek RNA zawierających motywy powtórzeniowe. Ponadto, parametr ten ma znaczenie w tworzeniu się kompleksów białka MBLN1 z RNA. Najbardziej efektywne okazały się oligonukleotydy złożone z 8 jednostek LNA (*ang. Locked Nucleic Acids*). Wyniki przedstawione na Ryc. 1, S1 i S10 są całkowicie przekonujące. Należy również podkreślić fakt, że te obserwacje zostały potwierdzone przez innych współautorów pracy na modelach komórkowych i modelu zwierzęcym.

Jednym z głównych zadań Doktorantki było wyznaczenie efektywności wiązania białka MBLN do cząsteczek RNA/powtórzeń CUG. W tym celu wykorzystano technikę immobilizacji białka na filtrach nitrocelulozowych. Stopień wiązanych oligonukleotydów znakowanych radioizotopowo wyznaczano monitorując ich obecność na wspomnianym filtrze nitrocelulozowym - gdy tworzyły one kompleks z białkami, oraz na filtrze nylonowym - gdy pozostawały one w stanie niezwiązany. W dobrze wykonanym eksperymencie informacje te umożliwiają uzyskanie krzywej wiązania, która w skali półlogarytmicznej ma postać sigmoidy o dobrze zdefiniowanych wartościach minimalnej i maksymalnej. W części przypadków takie krzywe znalazły się w recenzowanej pracy i nie budzą zastrzeżeń, jednakże część krzywych wiązania nie osiąga wysycenia, co powoduje, że ich interpretacja obciążona jest dużą niepewnością. W tych ostatnich przypadkach należałoby zwiększyć maksymalne stężenie immobilizowanego białka, co doprowadziłoby do uzyskania wysycenia i pozwoliło na w pełni wiarygodną interpretację wyników. Co stanęło na przeszkodzie, aby eksperyment przeprowadzić w ten sposób?

Podsumowanie

Rozprawa doktorska pani mgr Katarzyny Taylor dotyczy bardzo ważnego aspektu z zakresu biologii komórki, a mianowicie regulacji alternatywnego składania transkryptów w komórkach będących w stanie fizjologicznym i patologicznym, wynikającym z obecności mutacji dynamicznych, roli białka MBLN1 w tym procesie oraz poszukiwania inhibitorów tworzenia kompleksów tego białka z motywami powtórzeniowymi w RNA. Doktorantka szczegółowo opisała swój wkład w powstanie 4 bardzo ważnych publikacji, opublikowanych w renomowanych czasopismach międzynarodowych. W trakcie badań Doktorantka wykazała się wiedzą, sprawnością techniczną i precyzją. Jej wyniki stanowiły bardzo ważny wstęp do badań na modelach komórkowych i modelu zwierzęcym. Zebrane prace stanowią bardzo ważne osiągnięcie naukowe wyjaśniające mechanizmy alternatywnego składania transkryptów. Należy również podkreślić fakt, że uzyskane wyniki mają również bardzo ważne znaczenie ze względu na potencjał terapeutyczny.

Podsumowując, przedstawiona mi do recenzji praca pani mgr Katarzyny Taylor pt.: „*The RNA/MBNL interactions: structural basis, potential inhibitors and functional implications*” spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr Katarzyny Taylor do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na wysoką wartość rozprawy, wnioskuję o jej wyróżnienie stosowną nagrodą.

