



Dr hab. Marcin Nowotny

Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej, Warszawa

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Piotra Cywoniuka „Determination of functional RNA binding sites for MBNL using antisense oligonucleotides”.

Opisane w rozprawie badania dotyczą regulatorów alternatywnego splicingu – białek MBNL1, MBNL2 oraz MBNL3. Są to białka o bardzo interesującej biologii, a ich znaczenie dodatkowo zwiększa fakt, że są one zaangażowane w procesach patologicznych w dystrofii miotonicznej. Przedstawiona rozprawa składa się z trzech prac doświadczalnych opisujących szerokie i dogłębne badania białek MBNL. Wkład Doktoranta do tych prac polegał przede wszystkim na opracowaniu i zastosowaniu systemu weryfikacji w komórkach funkcji oddziaływania białek MBNL z ich miejscami wiązania w RNA.

Bardzo krótki wstęp pracy w sposób zwięzły i przejrzysty przedstawia białka MBNL. Zarówno tekst jak i ryciny są dobrze przygotowane i pomocne w zrozumieniu tematyki prac doświadczalnych. Kolejna część rozprawy to podsumowanie najważniejszych wyników. Trzy artykuły wchodzące w skład rozprawy zostały już ocenione przez recenzentów w procesie publikacji, dlatego w niniejszej recenzji nie będzie oceniana szczegółowo ich zawartość. Pragnę jednak podkreślić, że są to prace znakomite. Ich poziom techniczny i naukowy jest bardzo wysoki. W sposób systematyczny naświetlają bardzo złożone procesy oddziaływania trzech białek MBNL oraz ich licznych izoform z dużą liczbą miejsc wiązania w RNA. Badania te będą pomocne w opracowaniu terapii dystrofii miotonicznych, mają jednak też szersze znaczenie. System regulacji splicingu przez białka MBNL jest niebywale złożony i stąd ostateczny efekt jego działania opiera się na chaosie deterministycznym. Jest to mechanizm, który występuje w wielu systemach w komórce eukariotycznej. Aby zrozumieć działanie systemów opartych na chaosie deterministycznym, jest bardzo ważne szczegółowe zbadanie poszczególnych elementów danego systemu. Celem długofalowym jest zapewne opracowanie analitycznych modeli matematycznych lub modeli obliczeniowych, które będą skutecznie symulować te złożone systemy, a także generować nowe przewidywania weryfikowalne doświadczalnie.



Poniżej opisuję krótko zawartość poszczególnych prac z uwzględnieniem wkładu Doktoranta na podstawie załączonych oświadczeń.

Praca I (Cywoniuk P i wsp. *Scientific Rep.* 2017). W pracy tej Doktorant jest pierwszym dzielonym autorem. Jest to praca głównie metodyczna. Opisuje esej, który pozwala na weryfikację funkcjonalnego znaczenia miejsc wiązania dla białek MBNL. Esey ten polega na transfekcji komórek mini-genami podlegającymi alternatywnemu splicingowi i traktowaniu tych komórek modyfikowanymi chemicznie, antysensownymi oligonukleotydami (AON) 2'-O-Me-RNA, które wiążą się z miejscami wiązania białek MBNL i je blokują. Autorzy pokazali, że AON skutecznie hamują działanie MBNL. Metodologia ta okazała się mniej skuteczna dla blokowania sekwencji wiążących MBNL obecnych w egzonach, najprawdopodobniej przez antagonistycznie działanie innego regulatora splicingu, białka SRSF1. Autorzy opracowali również minigeny oparte o sekwencje Atp2a1 do których wprowadzana jest sekwencja rozpoznawana przez białka MBNL z innych transkryptów. W pracy pokazano, że te przeniesione sekwencje regulują splicing mini-genu, a traktowanie antysensownymi oligonukleotydami, które wiążą się z daną sekwencją blokuje ich działanie. Autorzy wykazali, że metodologia ta może być zastosowana do badania toksycznego działania powtórzeń trójnukleotydów obecnych u pacjentów z dystrofią miotoniczną. Może być zatem użyta do badań przesiewowych w poszukiwaniu leków. Metodologia ta stanowiła również podstawę badań w pozostałych pracach prezentowanych w rozprawie.

W pracy I Doktorant przeprowadził większość doświadczeń na komórkach oraz zaprojektował antysensowne oligonukleotydy dla pięciu z sześciu badanych regionów wiązanych przez MBNL. Doktorant zmierzył poziom alternatywnych transkryptów metodą PCR oraz przygotował części pracy dotyczące jego doświadczeń oraz szkic manuskryptu. Spośród trzech artykułów prezentowanych w rozprawie, w pracy I wkład Doktoranta był największy.

Publikacja II (Sznajder Ł i wsp. *Nucleic Acids Res.* 2016). W pracy tej Doktorant jest środkowym autorem spośród dziewięciu współautorów. Praca opisuje różnice we własnościach trzech paralogów MBNL: MBNL1, MBNL2 oraz MBNL3. Uzyskane wyniki pokazały, że białka te różnią się pod względem ich wkładu do regulacji alternatywnego

splicing: MBNL1 wywiera największy efekt, a MBNL3 najśłabszy. Autorzy pokazali, że może to wynikać z różnej dystrybucji tych białek między cytoplazmą a jądrem komórkowym. W tej pracy Doktorant zbadał metodą RT PCR poziom alternatywnych form mRNA białek MBNL w ludzkich tkankach płodu i organizmu dorosłego oraz w tkankach pacjentów z dystrofiami miotonicznymi typu pierwszego i drugiego. Doktorant pokazał, że wszystkie trzy białka MBNL rozpoznają te same sekwencje wywierając jednak efekt z różną siłą. Wykorzystał do tego podejście z minigenami oraz antysensownymi oligonukleotydami opisane w Publikacji I.

Publikacja III (Taylor K i wsp. *Nucleic Acids Res.* 2018). Doktorant jest środkowym autorem spośród sześciu autorów.

W pracy tej autorzy badali efekty położenia sekwencji rozpoznawanej przez białka MBNL w strukturze RNA. Pokazano, że MBNL wiąże silniej sekwencje położone w jednoniciowych RNA oraz, że co najmniej dwa motywy YCGY są potrzebne do wydajnego wiązania. Odstępy między motywami również wpływały na efektywność splicingu. Trzy paralogi MBNL oddziaływały z tymi samymi sekwencjami, ale położenie wiązanego motywu w strukturze RNA wywierało różne efekty na funkcje tych paralogów.

W tej pracy Doktorant wykonał doświadczenia kontrolne polegające na weryfikacji poziomu białek MBNL. Wyniki znalazły się w jednym z siedmiu paneli Ryciny 6 oraz Rycinach w materiałach uzupełniających. Oceniam, że spośród trzech przedstawionych prac w pracy III wkład Doktoranta był najmniejszy.

Doktorant przygotował swoją rozprawę w postaci trzech prac oryginalnych. Mam wątpliwości, czy była to decyzja słuszna. Przedstawione artykuły opisują prace zespołowe, w których każdy z autorów specjalizuje się w konkretnym typie doświadczeń. Nawet dla danego rodzaju doświadczeń (np. badania na komórkach czy projektowanie antysensownych oligonukleotydów w artykule I) praca była podzielona na kilku wykonawców. Dlatego ocena osiągnięć Doktoranta z jednej strony jest trudna, z drugiej jego wkład zostaje rozmyty w ogromnej ilości innych danych. Gdyby praca została przedstawiona w postaci klasycznej rozprawy opisującej jedynie wyniki mgr Cywoniuka z ewentualnym odniesieniem się do wyników kolegów z zespołu w dyskusji, osiągnięcia Doktoranta mogłyby być znacznie lepiej wyeksponowane.

Podczas obrony chciałbym prosić Doktoranta o przedyskutowanie następujących kwestii:

i) Jednym z kluczowych zagadnień w badaniach białek MBNL jest molekularny mechanizm regulacji splicingu przez te białka. Co wiadomo o tym mechanizmie i jakie badania i konkretne doświadczenia mogą posłużyć do jego wyjaśnienia?

ii) Jakie są najbardziej obiecujące strategie leczenia dystrofii miotonicznych powiązanych MBNL? W jaki sposób w opracowaniu tych potencjalnych terapii można wykorzystać wyniki badań, w których brał udział Doktorant i opracowane podczas tych badań metody?

Podsumowując, przedstawiona mi do oceny rozprawa dowodzi, że Doktorant miał istotny wkład do badań dotyczących niezwykle ciekawego systemu biologicznego o znaczeniu dla poważnych ludzkich chorób. Są to badania naukowe na bardzo wysokim poziomie technicznym i merytorycznym. Opisują bardzo ciekawy przykład wysoce złożonego systemu, składającego się z trzech białek, ich wielu izoform oraz wielu sekwencji docelowych RNA o zróżnicowanych strukturach. Efekt działania tak bardzo skomplikowanego systemu jest analogiczny do systemu obliczeniowego. Jest fascynujące, że ostateczny efekt tych obliczeń jest stabilny i zdeterminowany. Tak skomplikowane systemy są powszechnie obecnie u eukariontów i w szerszej perspektywie zrozumienie ich deterministycznego działania stanowi jedno z najważniejszych zadań współczesnej biologii.

Uważam, że rozprawa spełnia warunki określone w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i z pełnym przekonaniem stawiam wniosek o dopuszczenie Pana mgr Piotra Cywoniuka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Marcin Nowotny

