



Katedra i Klinika Neurologii

Prof. dr hab. n. med. Magdalena Kuźma-Kozakiewicz
Katedra i Klinika Neurologii
Warszawski Uniwersytet Medyczny

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr Ankura Gadgila

pt. „The effect of ALS-associated FUS mutations on U7snRNP activity and the expression of canonical histone genes in neuronal cells/ Wpływ mutacji FUS związanych z ALS na aktywność U7 snRNP I ekspresję genów kanonicznych histonów rdzeniowych w komórkach neuronalnych”

Stwardnienie boczne zanikowe (łac. sclerosis lateralis amyotrophica, SLA; ang. amyotrophic lateral sclerosis, ALS) jest najczęstszą chorobą neuronu ruchowego występującą u osób dorosłych oraz jednym z najcięższych schorzeń w neurologii. Początek choroby jest podstępny. Około 50-60 r.ż. pojawia się niewielka niesprawność kończyny górnej lub dolnej (70%) lub zaburzenia mowy (30%). W przebiegu uszkodzenia dróg korowo-rdzeniowych i korowo opuszkowych oraz jąder ruchowych nerwów czaszkowych i motoneuronów alpha rdzenia kręgowego, dochodzi do postępującego niedowładu mięśni kończyn i twarzy z ich późniejszym zanikiem. W związku z szybkim postępem uszkodzenia, w ciągu 3-5 lat od wystąpienia pierwszych objawów może dojść do porażenia czterokończynowego, anartrii, afagii, a więc utraty mowy i połykania, a także niewydolności oddechowej, będącej najczęstszą przyczyną zgonu. W ostatnim etapie choroby pacjenci mogą rozwinąć zespół zamknięcia (ang. locked-in syndrome), w którym - pomimo zachowanych funkcji poznawczych i wszystkich modalności czucia - tracą możliwość poruszania i mówienia, pozostając niejako „zamknięci w swoim ciele”. Pomimo zwiewnych dysfunkcji wykonawczych obecnych u blisko połowy pacjentów, jedynie 15% rozwija otępienie czołowo-skroniowe (ang. frontotemporal dementia, FTD). W około 90% przypadków choroba ma charakter sporadyczny (ang. sporadic ALS, SALS), w pozostałych jest dziedziczna, najczęściej w sposób autosomalny dominujący z wysoką penetracją. Najczęstsze mutacje stwierdzane są w genach *C9orf72*, *SOD1*, *FUS* i *TARDBP*, choć liczba genów związanych z zachorowaniem na SLA przekracza 50. Zidentyfikowane dotychczas mutacje są odpowiedzialne za ok. 70-75% przypadków rodzinnych i do 13% przypadków sporadycznych SLA.

SLA związane z mutacjami w genie *FUS*, stanowiące 4% przypadków FALS i do 1% SALS, wyróżnia się bardzo wczesnym wiekiem zachorowania (śr. 35 r.ż.) oraz bardzo szybkim postępem choroby. Z uwagi na piorunujący rozwój niedowładu i niewydolności oddechowej, stanowi duże wyzwanie kliniczne. Od stwierdzenia związku mutacji w genie *FUS* z zachorowaniem na SLA w 2009 r., opisano ponad 50 mutacji w tym genie. Ostatnia szeroka analiza fenotypowo-genotypowa wykazała istotną korelację pomiędzy wiekiem zachorowania a czasem przeżycia, który najcięższych przypadkach wynosił jedynie 6 miesięcy. Zależnie od mutacji, wyróżnia się 3 podtypy SLA związanego z mutacją *FUS*: 1) osiowe, z przeważającym opadaniem głowy i niedowładem kończyn górnych, 2) młodzieńcze, o bardzo ciężkim przebiegu, z początkiem opuszkowym, poprzedzone trudnościami w nauce oraz 3) łagodne, związane z późnym początkiem, przypominające klasyczne SLA [Grassano et al. 2022].

FUS jest szeroko rozpowszechnionym białkiem wiążącym DNA/RNA należącym (podobnie jak TDP-43 kodowane przez *TARDBP*) do rodziny niejednorodnych jądrowych rybonukleoprotein (hnRNP). Jest ono przede wszystkim zlokalizowane w jądrze komórkowym, gdzie bierze udział w regulacji ekspresji, w tym transkrypcji, składaniu pre-mRNA i stabilizacji mRNA. Może także przemieszczać się do cytoplazmy, gdzie jest m. in. zaangażowane w transport mRNA i proces translacji. Mutacje w genie *FUS* prowadzą do przesunięcia białka do cytoplazmy i jego akumulacji z tworzeniem złogów. Mechanizm uszkodzenia neuronów ruchowych przez mutacje w genie *FUS* nie jest jasny. Postuluje się zarówno utratę funkcji białka w jądrze, jak i uzyskanie dodatkowej toksycznej funkcji w cytoplazmie. Istotna jest także immunomodulacyjna rola zmutowanych cząsteczek FUS prowadząca do patologicznej aktywacji zapalnej mikrogleju i śmierci neuronów. W 2021r. rozpoczęto pierwsze badanie kliniczne 1-3 fazy z zastosowaniem oligonukleotydów antysensownych (ang. antisense oligonucleotides, ASO) skierowanych p/mRNA *FUS* (Jacifusen, NCT-04768972).

Ze względu na ciężki fenotyp i brak wystarczającej skuteczności dostępnego leczenia neuroprotektoryjnego, istnieje ogromna potrzeba poszerzenia wiedzy nt molekularnych mechanizmów leżących u podstaw uszkodzenia dróg ruchowych w SLA z mutacjami *FUS*, a w konsekwencji - identyfikacji nowych celów terapeutycznych w tym podtypie choroby. Stąd badania podjęte przez mgr **Ankura Gadgila**, analizujące wpływ mutacji w genie *FUS* na aktywność U7 snRN i na regulację ekspresji kanonicznych histonów rdzeniowych w komórkach neuronalnych, znajdują uzasadnienie naukowe.

Przedstawiona do oceny praca doktorska stanowiąca cykl publikacji, napisana jest w języku angielskim, poza streszczeniem w języku polskim. Praca liczy 63 strony, a jej układ i proporcje poszczególnych części są prawidłowe.

CELEM pracy była ocena wpływu mutacji w genie *FUS* na aktywność U7 snRN oraz efektywność transkrypcji i dojrzewanie pre-mRNA kanonicznych histonów rdzeniowych, jako mechanizmu molekularnego leżącego u podstaw SLA.

W syntetycznym **WSTĘPIE** (*Background and introduction*) Doktorant opisał charakter schorzenia, w tym sposób dziedziczenia w przypadkach rodzinnych, a także potencjalną rolę mutacji w genie *FUS* w patogenezie uszkodzenia neuronów ruchowych w SLA. Ta część wydaje się dość lakoniczna i nie oddaje wieloczynnikowej patogenezy SLA, w tym szeregu mechanizmów związanych bezpośrednio z tematyką rozprawy, a więc zaburzeń regulacji translacji, splicingu, transkrypcji, tworzenia złogów i procesu autofagii, zarówno w przypadkach sporadycznych SLA, jak i warunkowanych mutacjami w innych genach. Znacznie szerzej Autor opisał natomiast wcześniejsze wyniki uzyskane przez swój zespół, wykazując naukową drogę powstania koncepcji stanowiącej podstawę naukowej dysertacji. Na podstawie przeprowadzonych badań, zespół wykazał, że białko FUS jest pozytywnym regulatorem transkrypcji genów histonów zależnych od replikacji i bierze udział w regulacji ich pre-mRNA na końcu 3' w fazie S cyklu komórkowego. Na tej podstawie Autor wysunął hipotezę, że FUS może brać udział w hamowaniu zależnej od U7 snRNP ekspresji genów histonów poza fazą S cyklu, tym samym hamując szkodliwą dla komórek syntezę dodatkowych białek histonowych.

W dalszej części (*The main thesis and achievements of the work*) Autor zawarł **opis 2 publikacji** stanowiących rozprawę doktorską: eksperymentalnej i przeglądowej.

W pierwszej wykazał, iż zmutowane FUS łączy się w cytoplazmie z U7 snRNP, co prowadzi do upośledzenia jego funkcji. W wyniku połączenia dochodzi do zmniejszenia transkrypcji histonów w proliferujących komórkach glejowych oraz dysregulacji w/w transkrypcji powodującej nadmierną produkcję białek histonowych w zróżnicowanych, a więc nieproliferujących komórkach neuronalnych. Badania prowadzone były na komórkach HeLa i SH-SY5Y (knocked-out dla *FUS*) transfekowanych plazmidami zawierającymi odpowiednio dziki lub zmutowany (dwie niezależne mutacje) *FUS*. Komórki badane były w stadium proliferacji lub zróżnicowania w celu oceny wpływu kompleksu FUS z U7 snRNP w obu ich rodzajach.

Lokalizacja FUS oraz U7 snRNP została następnie zbadana w pierwotnych hodowlach neuronów szczurzych. Wyniki sugerują ze złogi zmutowanego białka FUS sekwestrują U7 snRNP i zatrzymują nieaktywny kompleks w cytoplazmie. Kolejna analiza dotyczyła potencjalnego wpływu mutacji *FUS* na polimerazę RNA genów dla histonów zależnych od replikacji (RDH), a także H2AC, H2BJ i H4J. Badanie przeprowadzone za pomocą techniki ChIP w proliferujących komórkach wykazało zredukowaną obecność polimerazy RNA w komórkach transfekowanych zmutowanym *FUS* w porównaniu transfekowanych szczepem dzikim, co może świadczyć o hamowaniu transkrypcji genów RDH z powodu osłabionego przyłączania do polimerazy RNA do genów kodujących białka histonowe. Dodatkowo na podstawie obniżonej ilości transkryptów wykazano, że proliferujące (ale nie dojrzałe) komórki SH-SY5Y i HeLa transfekowane zmutowanym *FUS* wykazują upośledzoną efektywność procesów obróbki pre-mRNA *RDH*. Nie zaobserwowano podobnego efektu w dojrzałych komórkach neuronalnych. W interpretacji Autora brak powyższego efektu związany był z syntezą poliadenylowanych transkryptów histonów w procesie niezależnym od U7 snRNP.

W drugiej publikacji Autor opisał potencjalne zastosowanie U7 snRNP w terapii genowej związane z faktem, że białko to – w odróżnieniu do innych rybonukleoprotein - nie jest zaangażowane w splicing a w obróbkę końca 3' pre-mRNA histonów zależnych od replikacji. Zmodyfikowane U7 snRNP, którego celem jest składanie pre-mRNA może przyczynić się do pominięcia lub włączenia wybranych eksonów. Autor opisał badania przedkliniczne z zastosowaniem zmodyfikowanych U7 snRNP przeprowadzone dotychczas w modelach komórkowych lub zwierzęcych wybranych schorzeń (raka podstawnokomórkowego, raka piersi, wrodzonej niewydolności nadnerczy, DM1, DMD, SMA, SLA z wybranymi mutacjami w genie *SOD1*, beta-talasemia, HIV/AIDS). Przedyskutował także korzyści i ograniczenia stosowania opisanego podejścia terapeutycznego.

W **PODSUMOWANIU (Summary)** Autor zawarł opis konstrukcji swojej pracy doktorskiej, a także opisał swoją dalszą ścieżkę naukową.

Uwagi merytoryczne:

WSTĘP:

W przedstawionej charakterystyce SLA znajduje się kilka znaczących błędów:

- rozpoznanie SLA jest przede wszystkim kliniczne, z potwierdzeniem uszkodzenia neurogennego w badaniu elektromiograficznym (EMG) i wykluczeniu innych przyczyn uszkodzenia górnego i dolnego neuronu ruchowego na podstawie ENG, MRI, ewentualnie badań krwi, płynu mózgowo-rdzeniowego (ale nie moczu), natomiast nie wykonuje się biopsji mięśni ani nerwów.

- wbrew opisowi, obecnie na świecie zarejestrowane są trzy leki neuroprotekcyjne: riluzol, który nieznacznie przedłuża przeżycie, edarawon spowalniający narastanie niesprawności, oraz (choć dopiero od 7.2022, a więc zapewne już po złożeniu obecnej pracy) TUDCA+PB wpływający na oba te parametry oraz spowolnienie narastania niewydolności oddechowej. Prowadzone są ponadto próby terapii genowej (tofersen, ASO p/zmutowanym *SOD1*) dla chorych z SLA związanym z mutacjami w genie *SOD1*.

Nie opisano także patomechanizmu SLA, w tym szlaków związanych z mutacjami w innych genach. Na szczególną uwagę zasługuje *TARDBP*, kodujący podobnie jak FUS białko wiążące RNA i ulegające translokacji do cytoplazmy w wyniku mutacji związanych z SLA i/lub orępieniem czołowo-skroniowym (FTD). Z punktu widzenia potencjalnej terapii z zastosowaniem badanego przez Doktoranta mechanizmu, ważne byłoby wspomnienie genu *G9orf72*, którego mutacje związane z SLA mają charakter dynamiczny.

Pomimo świadomości, iż Doktorant nie ma wykształcenia medycznego, przygotowanie dysertacji o charakterze translacyjnym wymaga pogłębienia wiedzy o zagadnieniach, które bezpośrednio łączą się z jej tematyką, oraz wykazania się dbałością o prawidłowy przekaz.

We WSTĘPIE zabrakło także ogólnego opisu regulacji ekspresji białek histonowych, który stanowiłby tło dla przedstawienia wyników własnych badań. Zrozumienie założeń pracy wymagało zasięgnięcia informacji z innych źródeł, część z nich zawarta była w samych pracach, które – co wynika z charakteru dysertacji – czyta się w dalszej kolejności.

Sekcja dotycząca GŁÓWNEGO ZAŁOŻENIA PRACY I WYNIKAJĄCEGO Z NIEGO OSIĄGNIĘCIA (*The main thesis and achievements of the work*) ma charakter opisu (ciekawej skądinąd) drogi, którą Doktorant przebył pracując nad założonym problemem badawczym. Pozwala zrozumieć planowany i ostateczny kształt badań i sposób uzyskania wyników wobec napotkanych trudności technicznych. Brakuje w niej jednak zbiorczego opisu nowatorskiego elementu pracy doktorskiej (naukowego i/lub metodologicznego), a także sformułowania wniosków odpowiadających wprost założonym celom. Informacje znajdują się w tekście, jednak ich identyfikacja wymaga dokładnego prześledzenia poszczególnych paragrafów. W pracy brakuje też jasnego podsumowania uzyskanych wyników, które znajduje się zazwyczaj w sekcji PODSUMOWANIE (Summary), tutaj przeznaczonej na opis dalszych kroków kariery zawodowej Doktoranta.

Dodatkowe pytania, które wydają się istotne w związku z translacyjnym znaczeniem pracy:

1. fenylomaślan sodu (PB) stanowiący jeden ze składników zarejestrowanego ostatnio w Kanadzie i US leku (TUDA+PB) jest inhibitorem deacetylazy histonowej (HDAC). W wyniku jego zastosowania u ludzi, obserwowano istotne zwiększenie acetylacji histonów, co najpewniej prowadzi do ułatwienia transkrypcji. Czy zastosowanie w/w preparatu mogłoby mieć dodatkowe działanie ochronne wobec neuronów ruchowych w SLA związanym z mutacją *FUS*, czy te mechanizmy nie są zależne?
2. jakie implikacje kliniczne ma fakt upośledzonej efektywności procesów obróbki pre-mRNA *RDH* (stwierdzonej w oparciu o liczbę transkryptów) w proliferujących ale nie dojrzałych komórkach?
3. czy Badacze uzyskali opinię właściwej Komisji Bioetycznej na wykorzystanie iPS od chorych z mutacją *FUS*?

* Uwagi edytorskie: w pracy nie uniknięto drobnych błędów stylistycznych czy literówek jak np. "observed.. observations", "mention ...mentioning", "breathe" itp.

Przedstawione uwagi nie mają wpływu na ogólną ocenę pracy, która w konsekwentnie zaplanowanych i przeprowadzonych badaniach osiągnęła postawione cele.

Rozprawa napisana jest poprawnym językiem, w sposób syntetyczny, a jej strona graficzna jest na dobrym poziomie. Znaczna liczba cytowanych prac z piśmiennictwa ostatnich 20 lat, świadczy o szerokim zainteresowaniu Doktoranta omawianą tematyką.

Podsumowując, przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska **mgr Ankura Gadgila pt. „The effect of ALS-associated FUS mutations on U7snRNP activity and the expression of canonical histone genes in neuronal cells (Wpływ mutacji FUS związanych z ALS na aktywność U7 snRNP I ekspresję genów kanonicznych histonów rdzeniowych w komórkach neuronalnych”** stanowi ciekawy i istotny wkład do badań nad procesem regulacji ekspresji RNA związanej z mutacjami w genie *FUS*.

Rozprawa spełnia wymogi stawiane pracy doktorskiej określone w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz.U. z 2003r. nr 65, poz. 595, nowelizacja Dz.U. z 2016r., poz 882, 1311, z 2017r. poz. 859). Dlatego też wnioskuję Wysockiej Radzie Naukowej dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr Ankura Gadgila do publicznej obrony.

Warszawa, 10.10.2022


prof. dr hab. n. med. Magdalena Kuźma-Kozakiewicz