

Poznań, 22.10.2023r.

dr hab. Agnieszka Fiszer
Zakład Biotechnologii Medycznej
ICHB PAN w Poznaniu

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Darii Niewiadomskiej p.t.:
Rola elementów regulatorowych cis w zmutowanym mRNA *FMR1* zawierającym ekspansję
powtórzeń CGG w tworzeniu struktur typu *R-loop* i regulacji niekanonicznej translacji
patogenne białka

Praca doktorska została wykonana w Laboratorium Terapii Genowej, w Zakładzie Ekspresji Genów, w Instytucie Biologii Molekularnej i Biotechnologii na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu pod opieką Prof. dr. hab. Krzysztofa Sobczaka.

Tematyka pracy jest związana z wybranymi mechanizmami molekularnymi, które są aktywowane w przypadku mutacji w genie *FMR1*, które prowadzą do rozwoju chorób neurologicznych. Warto podkreślić już na wstępie, że są to badania bardzo ważne dla lepszego zrozumienia podstaw molekularnych tych schorzeń oraz kluczowe dla opracowywania skutecznych podejść terapeutycznych.

Mutacja w genie *FMR1*, występującym na chromosomie X, została opisana ponad 30 lat temu, w 1991 roku, w kontekście zespołu łamliwego chromosomu X (FXS). Mutacja ta polega na nadmiernym wydłużeniu ciągu powtórzeń CGG w 5'UTR genu *FMR1*. W przypadku prawidłowego genu występuje około 30 powtórzeń motywu trzech nukleotydów CGG, natomiast z FXS związana jest ekspansja ciągu powyżej 200 powtórzeń. Dodatkowo w 1999 roku powiązано występowanie ciągu CGG w *FMR1* w zakresie 50-200 powtórzeń (tzw. premutacja) z zespołem drżenia i ataksji związanym z łamliwym chromosomem X (FXTAS). Naukowcy od wielu lat wnikliwie badają procesy molekularne, które są aktywowane bądź zmienione w przypadku tych kontentnych mutacji. Nadal są poznawane dodatkowe elementy mające znaczenie w zaburzeniach prowadzących do symptomów choroby i w rezultacie nakreślona jest duża złożoność zależnych od siebie zmienionych procesów komórkowych. We wstępie Doktorantka przedstawiła omówienie podstawowych mechanizmów molekularnych, które ulegają zaburzeniu w przypadku FXS i FXTAS. Szczególna uwaga została poświęcona mechanizmowi niekanonicznej translacji aktywowanej na zmutowanym transkrypcie *FMR1* oraz roli tworzących się pętli R, czyli struktur oddziałujących ze sobą DNA i RNA, formowanych w pobliżu regionu miejsca startu transkrypcji *FMR1*. W związku z niepełnym rozumieniem tych procesów zostały jasno sformułowane cele badań niniejszej pracy doktorskiej.

Rozdział „Materiały i metody” został przygotowany z dużą starannością. Warte jest podkreślenia, że Doktorantka ujęła w tej części opisy uwzględniające rozwiązywanie napotykaných trudności.

Rozdział poświęcony omówieniu wyników jest obszerny i podzielony na dwie główne części. W pierwszej części pracy celem było powiązanie efektu tworzenia pętli R w *locus FMR1* z wydajnością transkrypcji tego genu. W tym celu wykonano eksperymenty *in vitro* oraz w hodowlach komórkowych. Doktorantka zaprojektowała i otrzymała odpowiednie konstrukty z ciągami CGG w kontekście genu *FMR1* oraz opracowała metodę pozwalającą na analizę tworzenia pętli R po reakcjach *in vitro*. Uzyskane wyniki pozwoliły wykazać negatywny wpływ tworzenia pętli R na wydajność transkrypcji *FMR1* oraz zniesienie tego efektu po dodaniu oligonukleotydów antysensowych naceLOWanych w ciąg powtórzeń CGG, ASO-CCG. Na tej podstawie został zaproponowany model oddziaływania tych ASO z DNA i RNA *FMR1* oraz przystąpiono do eksperymentów w hodowlach linii komórkowych wyprowadzonych od pacjentów z FXTAS i FXS. W tych badaniach Doktorantka wykazała wpływ ASO-CCG na wzrost poziomu mRNA *FMR1* w liniach FXTAS oraz zależność tych efektów od RNazy H1. Efekt podniesienia poziomu ekspresji *FMR1* udało się także uzyskać na jednej z linii FXS, jednak tylko na poziomie transkryptu.

W drugiej części pracy celem było określenie wpływu czynników, takich jak: sekwencja nukleotydowa, struktura drugorzędowa RNA i długość ciągu powtórzeń, na wydajność niekanonicznej translacji inicjowanej na sekwencji powtórzonej (RAN translacji), prowadzącej do powstawania białka poliglicynowego (FMRpolyG) na matrycy zmutowanego transkryptu *FMR1*. W tym celu Doktorantka zaprojektowała i otrzymała szereg konstruktów z wprowadzanymi zmianami w sekwencji, które były testowane w liniach komórkowych HEK-293. Na podkreślenie zasługuje fakt, że dwie metody były stosowane dla analizy poziomu białka FMRpolyG, hybrydyzacja typu western i detekcja luminescencji, co pozwoliło traktować wyniki z większą pewnością. Doktorantka wykazała, że alternatywne powstawanie białka poliargininowego (FMRpolyR), choć na niskim poziomie, ma wpływ na powstawanie białka poliglicynowego. Dalszym analizom zostało poddane główne miejsce inicjacji niekanonicznej translacji właśnie białka poliglicynowego, ACG(+1). Modyfikowany był kontekst sekwencji Kozak, wzmacniany lub osłabiany, zmieniano sam kodon ACG i jego lokalizację, i określono wpływ tych zmian na wydajność translacji białka FMRpolyG. Przetestowana także została hipoteza o wpływie odległości między miejscem startu translacji a stabilną strukturą drugorzędową w RNA na wydajność translacji FMRpolyG. Ta część wyników badań dowodzi dużej dokładności i dociekliwości naukowej Doktorantki.

Ogólnie wyniki badań są klarownie przedstawione graficznie i wnikliwie opisane w tekście. Opisy do rycin również zawierają bardzo szczegółowe informacje odnośnie eksperymentów, których wyniki są prezentowane. Na podstawie otrzymanych wyników Doktorantka proponuje konkretne modele dla oddziaływań molekularnych zachodzących w chorobach FXTAS i FXS, jednocześnie komentuje złożoność analizowanych procesów.

Poniżej umieszczone są moje komentarze, które nasunęły się mi podczas czytania Rozprawy. Doktorantka może się odnieść do nich w celu wyjaśnienia moich pewnych wątpliwości (czy zaspokojenia ciekawości) i dla dodatkowej dyskusji wyników w czasie obrony:

- Na Rycinie 20 zaprezentowane są wyniki analizy wyciszenia ekspresji genów celowanych przez siRNA na poziomie obniżenia transkryptów. Czy była podejmowana próba zbadania tych efektów na poziomie białek? Ogólnie dla dużej grupy białek czas 48 h od transfekcji siRNA jest wystarczający dla uzyskania obniżenia poziomu białka. Tym niemniej warto mieć takie potwierdzenie. Przykładowo, wg pracy o numerze doi: 10.18632/oncotarget.8446, białko DHX9 charakteryzuje się względnie wysoką stabilnością, stąd może być niepewne czy poziom DHX9 udało się znacząco obniżyć w komórkach po 48 h od podania siRNA.
- Stosunkowo wysokie stężenie ASO było stosowane, 200 nM. Nie znalazłam jednak informacji, czy przykładowego obrazu, jak komórki fibroblastów wyglądały, jaka była ich śmiertelność po transfekcji.
- Wydaje mi się, że wyniki zaprezentowane na Rycinie 22 i dotyczące poziomu transkryptu *FMR1* po traktowaniu ASO-CCG i obniżeniu poziomu RNazy H, mogłyby być dokładniej skomentowane. Są one podsumowane zdaniem (strona 87) konkludującym, że w trzech analizowanych liniach traktowanych siRNA skierowanym na mRNA RNazy H1 wzrost poziomu mRNA *FMR1* (zaindukowany przez ASO-CCG) był znacząco zmniejszony. Taki efekt jest widoczny, ale dla dwóch z analizowanych linii, nie dla linii z dwoma zmutowanymi allelami *FMR1*. Drugie zdanie konkluduje, że poziom pre-mRNA pozostał niezmienny w tych warunkach (domyślnie: dla obniżenia poziomu RNazy H), jednak szczególnie dla linii z jednym allelem zmutowanym *FMR1* jest widoczny na wykresie efekt zniesienia wpływu ASO-CCG na wzrost ekspresji *FMR1*. Pomimo, że te efekty mogą nie mieć wpływu na całościową interpretację wyników, to być może warto je opisać dokładniej.
- Dla wyników przedstawionych na Rycinie 23, dotyczących poziomu ekspresji *FMR1* w fibroblastach FXS po traktowaniu inhibitorem metylacji DNA, mogłaby zostać przedstawiona większa interpretacja odnośnie uzyskanego poziomu aktywacji. Zestawione zostały wyniki półilościowej metody RT-PCR i ilościowej analizy RT-qPCR. Czy w tych analizach był uwzględniany endogenny poziom ekspresji *FMR1* z linii z prawidłowym genem? Mógłby on stanowić odniesienie do prezentowanych wyników i dostarczyć informacji jak wysoki poziom aktywacji *FMR1* udało się uzyskać.
- Czy testowane było użycie ASO o sekwencji powtórzonej CGG, czyli komplementarnego do nici antysensowej w DNA i transkryptu antysensowego *FMR1*? Jeśli nie, mogą być przedstawione krótko rozważania o spodziewanych efektach działania takiego ASO.
- Niektóre z wyników z użyciem metody detekcji luminescencji dla określenia poziomu białka FMRpolyG charakteryzują się dużym rozrzutem (np. Rycina 29 b, 32 e). Czy ten rozrzut uzyskiwanych wyników mógł po części wynikać z stosowania w transfekcji dwóch plazmidów, osobnego z Nluc i Fluc? (jeśli zrozumiałam dobrze wg opisu na stronie 48 taki układ był ostatecznie stosowany). Czy raczej wynika on z zróżnicowanych efektów komórkowych?
- Czy planowane jest dalsze testowanie w modelach FXTAS ASO3, jako mogącego wpływać na obniżenie poziomu białka FMRpolyG?

Wyniki badań Doktorantki dotyczące pierwszego wątku zostały w dużym zakresie opublikowane w 2021 roku artykule w bardzo prestiżowym czasopiśmie *Nature Communications* (IF₂₀₂₂ 16,6). Mgr Daria Niewiadomska jest trzecim autorem w tej publikacji, a jej wyniki zostały ujęte na jednej z rycin głównych oraz na rycinach suplementarnych. W artykule tym opisane są wyniki

badań, które w szerszym zakresie dotyczyły efektów działania ASO-CCG w liniach komórkowych oraz testowania tychże ASO w modelu mysim FXTAS. Wyniki Doktorantki stanowią ważny element tej obszernej publikacji. Wyniki badań dotyczące drugiego wątku będą stanowić zapewne istotną część następnej publikacji (dalsze eksperymenty dla tych badań są wskazane w dyskusji rozprawy).

Zawarta w rozprawie dyskusja jest obszerna i zawiera również prezentację wyników wstępnych dalszych badań Doktorantki. M.in. wnikliwie jest opisana różnorodność struktur formowanych w miejscu inicjacji transkrypcji i regionie powtórzeń genu *FMR1*, przedyskutowane są podejścia zmierzające do aktywacji transkrypcji genu *FMR1* w FXS, czy też dogłębnie rozważane są podstawy wrażliwości inicjacji translacji białka FMRpolyG na zmiany w sekwencji lub strukturze w otoczeniu miejsca startu tej niekanonicznej translacji. Formułowane wnioski i odniesienia do opublikowanych badań świadczą o dużej dojrzałości naukowej mgr Darii Niewiadomskiej. Ogólnie odniesienia do literatury w całości rozprawy są liczne i wskazują na dobre rozeznanie Doktorantki w tematyce badań.

Z obowiązku recenzenta przedstawiam drobne uwagi (nie wymagające odnoszenia podczas obrony, ale może przydatne dla Doktorantki):

- Ryciny i tabele mogłyby dla pełnej jasności mieć zawsze odnośniki w tekście.
- Nie wszystkie wprowadzone skróty były konsekwentnie stosowane w tekście, np. ASO, ORF.
- Nieścisłością jest informacja podana w „Materiałach i metodach” w podrozdziale 3.18, dotycząca co najmniej trzech powtórzeń wszystkich eksperymentów *in vitro* i komórkowych. W opisanych dalej wynikach są przypadki, gdzie liczba powtórzeń wynosi dwa, np. dla wyników prezentowanych na Rycinie 20 i 23. Jest to akceptowalne dla niektórych analiz, tym niemniej w Metodach mogło by znaleźć się stwierdzenie bardziej trafne.
- W „Materiałach i metodach” bardziej trafne w podawaniu stosowanych stężeń roztworów aminokwasów czy antybiotyku byłoby podawanie końcowego stężenia jako 1x a nie 1% (wyjściowy roztwór są 100-krotnie stężone, a nie 100%)
- Wyniki analiz hybrydyzacji typu western prezentowane jako fragmenty skanów membran powinny zawierać odznaczenie migracji markera wielkości białek.
- Brak jest oznaczeń ścieżek przy obrazach membran z hybrydyzacji typu western na Rycinie 31 b (trzy pierwsze ścieżki to zapewne konstrukt 16 CGG, a trzy następne 85 CGG).

W końcowych wnioskach chciałabym podkreślić, że przygotowana przez mgr Darię Niewiadomską rozprawa zrobiła na mnie duże wrażenie dzięki dojrzałości z jaką została napisana oraz precyzji w projektowaniu i wykonaniu eksperymentów. Ujęte zostały w rozprawie również interesujące szczegółowe odniesienia do badań Marilyn Kozak, wskazujące dla ciekawość i dociekliwość naukową Doktorantki. Do głównych osiągnięć opisanych w niniejszej rozprawie należą:

- wykazanie, że ASO-CCG zaburzają strukturę pętli R w *locus FMR1* i, dla określonych mutacji tego genu, powodują wzrost jego transkrypcji;
- określenie wpływu kontekstu sekwencji nukleotydowej i struktury drugorzędowej w 5'UTR mRNA *FMR1* na wydajność translacji białka FMRpolyG.

Ważne są implikacje uzyskanych wyników dla dalszego rozwijania podejść terapeutycznych dla FXTAS i FXS. Ponadto, w mojej opinii, uzyskane wyniki mają szerszy kontekst, poza badanymi chorobami wywoływanymi mutacjami w genie *FMR1*. Zarówno badania oddziaływań typu pętli R,

jak i niekanonicznej translacji, mają odniesienie do poznawania różnorodności mechanizmów regulacji ekspresji genów.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Darii Niewiadomskiej stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, potwierdza uzyskaną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie nauk biologicznych oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Tak więc, przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska całkowicie spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-2 Ustawy z dnia 20.07.2018 r., Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2023 r. poz. 742). W związku z tym wnoszę o dopuszczenie mgr Darii Niewiadomskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem,

