



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii



Prof. dr hab. Joanna Kufel
Instytut Genetyki i Biotechnologii
Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Warszawa, 26-10-2023

Recenzja pracy doktorskiej mgr Darii Niewiadomskiej pt. “The role of *cis*-regulatory elements in mutant mRNA of *FMRI* gene containing expanded CGG repeats in R-loop formation and regulation of noncanonical translation of pathogenic protein.”

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Darii Niewiadomskiej została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Krzysztofa Sobczaka w Laboratorium Terapii Genowej, w Instytucie Biologii Molekularnej i Biotechnologii na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Wyniki pracy doktorskiej zostały zawarte w publikacji w *Nature Communications* z 2021, w której mgr. Niewiadomska jest trzecią autorką. Ponadto jest też współautorką dwóch dodatkowych publikacji w *Nucleic Acids Research* w 2021 i *Scientific Reports* w 2022, które nie są bezpośrednio związane z rozprawą. Badania, które są podstawą doktoratu, były finansowane przede wszystkim ze środków Narodowego Centrum Nauki oraz Fundacji na rzecz Polskiej Nauki.

Tematyka pracy doktorskiej jest ściśle powiązana z głównym zakresem badań w laboratorium prof. Sobczaka dotyczących m.in. biogenezy i funkcji cząsteczek RNA zawierających nadmierną liczbę powtórzeń trójnukleotydowych.

W swojej pracy doktorantka wyodrębniła dwa główne cele, które zostały jasno i szczegółowo przedstawione: 1. Potwierdzenie tworzenia się hybryd RNA-DNA zwanych pętlami R przez wydłużone powtórzenia CGG w rejonie 5'UTR *FMRI* *in vitro* i *in vivo*, określenie ich wpływu na transkrypcję *FMRI* oraz wykazanie możliwości przywrócenia transkrypcji tego genu przez zmianę stabilności pętli R na skutek oddziaływania modyfikowanych antysensownych oligonukleotydów (ASO-CCG) z powtórzeniami CGG; 2. Zbadanie wpływu elementów *cis* znajdujących się w rejonie 5'UTR *FMRI*, m.in. kontekstu kodonu start, stabilnej struktury RNA w tym rejonie oraz długości powtórzeń CGG, na wydajność translacji wariantu białka FMRpolyG inicjowanego z niekanonicznych kodonów ACG lub GUG. Oba cele zostały w pełni zrealizowane i dostarczyły interesujących odpowiedzi na postawione pytania. W recenzji nie będę opisywać uzyskanych wyników, ponieważ są dużo lepiej przedstawione w dysertacji. Warto tylko zaznaczyć, że każdy rozdział wyników poprzedza krótkie wprowadzenie, które służy przypomnieniu i wyjaśnieniu założeń przeprowadzonych i opisanych w tym rozdziale doświadczeń.

Praca zawiera wszystkie niezbędne elementy, które są ujęte w sposób zrozumiały, usystematyzowany i przemyślany. Zarówno obszerny i szczegółowy Wstęp jak i bardzo gruntowne Materiały i Metody zostały opracowane we właściwy sposób i dostarczają informacji w pełni wystarczających do swobodnego śledzenia części eksperymentalnej pracy. Szczególnie ciekawe z mojego punktu widzenia jest omówienie molekularnych podstaw FXTAS i FXS, czyli m.in. translacji RAN i wyciszenia ekspresji przez powstawanie pętli R. Także Wyniki i Dyskusja są przedstawione rzetelnie a jednocześnie zajmująco. Doświadczenia opisane w pracy są odpowiednio zaprojektowane i zawierają w większości przypadków właściwe kontrole, zastosowane procedury eksperymentalne są dobrze opisane i przeprowadzone, a dyskusja wyczerpująca i fachowa. Wykonane przez autorkę eksperymenty wymagały zastosowania technik zarówno *in vitro* jak i *in*

vivo, obejmujących również bardziej zaawansowane podejścia, które zostały zoptymalizowane podczas realizacji projektu, takie jak detekcja pętli R *in vitro*, frakcjonowanie subkomórkowe, czy badanie translacji w systemie reporterowym podwójnej lucyferazy (NanoLuciferase reporter assay).

Dysertacja jest napisana po angielsku, poprawnie i zrozumiale, ale w dość nierównym stylu, niektóre zdania i opisy są nieco zagmatwane i pokrętnie. Obecne są niestety liczne błędy i niezręczności językowe, głównie składniowe i stylistyczne, ale nie mają dużego wpływu na ogólny poziom pracy i przeważnie nie utrudniają odbioru treści. Z kolei staranne opracowanie ze strony edytorskiej i graficznej nie budzi zastrzeżeń, wszystkie Ryciny są bardzo dobrze przedstawione i dokładnie opisane. Całość rozprawy świadczy o dużej wiedzy i doświadczeniu kandydatki oraz jej zaangażowaniu w zaplanowanie i konsekwentną realizację poszczególnych etapów pracy doktorskiej.

Omówienie szczegółowe, uwagi krytyczne i pytania.

Wstęp

W opisie mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za zespół FXS doktorantka podała dwie przyczyny, ekspansję powtórzeń do ponad 200, szczególnie w połączeniu z brakiem przedzielających je normalnych sekwencji, oraz hipermetylację cytozyn w rejonie promotora genu *FMRI* oraz 5'UTR *FMRI* mRNA. Czy wiadomo w jaki sposób te dwa aspekty są ze sobą powiązane, czyli w jaki sposób ekspansja powtórzeń wywołuje hipermetylację DNA, czy głównie poprzez tworzenie pętli R czy raczej przez inne mechanizmy?

Czy termin „pełna mutacja” jest związany tylko z występowaniem ponad 200 powtórzeń? Czy są jakieś inne mutacje wywołujące FXS?

Omawiając tworzenie się patologicznych agregatów rybonukleoproteinowych, autorka skupia się głównie na ciałkach jądrowych. Czy wiadomo jest coś więcej o agregatach cytoplazmatycznych? Np. jednym z białek wiążących rCGGexp jest Pur α , które lokalizuje się w cytoplazmie i wydaje się, że ma wpływ na etiologię FXTAS.

W przypadku mechanizmu translacji RAN *FRMI*, autorka wspomina, że przebiega w sposób zbliżony do kanonicznej, czyli jest zależna od kapu i czynników eIF4E i eIF4A, tylko jest mniej wydajna. Następnie jednak opisuje wpływ struktur drugorzędowych RNA czy możliwość zachodzenia inicjacji zależnej od IRES, co odróżnia oba mechanizmy. Nie wspomina natomiast o istotnych różnicach związanych z tym, że inicjacja translacji z kodonów innych niż AUG, także w przypadku translacji RAN, jest zależna od stresu oraz jest modulowana przez wybrane czynniki translacyjne. Regulacja ta zachodzi np. przez fosforylację eIF2 α , oraz względny poziom czynników związanych z wyborem miejsca inicjacji translacji takich jak eIF1, eIF2 czy eIF4, jak również helikaz eIF4D i 4H. Są też prace sugerujące udział alternatywnych czynników eIF2A, eIF2D i DENR zastępujących kompleks eIF2, albo nawet świadczące, że translacja RAN może również zachodzić niezależnie od kapu w sposób zbliżony do mechanizmu IRES. Poproszę kandydatkę o komentarz na ten temat.

Czy wiadomo coś więcej na temat potencjalnych produktów białkowych powstałych na skutek translacji *FRMI* zależnej od IRES?

Czy znane są dane sugerujące, że produkty translacji RAN *FRMI* funkcjonują jako uORF i obniżają translację FMRP?

Czy dwie różne hipotezy, pierwsza dotycząca wpływu pętli R na wyciszenie ekspresji *FRMI* przez stymulowanie heterochromatyzacji tego regionu DNA i druga opisująca udział pętli R w kontrakcji powtórzeń CGG i przywróceniu właściwego poziomu FMRP, dadzą się jakoś pogodzić, czy są ze sobą sprzeczne? Powstawanie nadmiernej liczby pętli R może skutkować aktywacją odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Czy i w jaki sposób DDR może przyczyniać się do patogenezы FXTAS?

Materiały i metody

Dość nietypowe jest umieszczanie cząstkowych wyników i kontroli w tej części pracy (Ryciny 9 i 11), jest to jednak dopuszczalne w kontekście problemów z uzyskaniem odpowiednich produktów translacji i opisu kolejnych konstruktów. Mimo schematów na Rycinie 9, w dalszym ciągu opis ten jest nie do końca jasny.

Wyniki

Rozdział Wyniki jest nietypowo podzielony na dwie części, które są powiązane z dwoma głównymi celami i przedstawiają wyniki ściśle z nimi związane. Taki podział jest w pełni uzasadniony założeniami doktoratu i odrębną zawartością każdej z części.

W pierwszej z nich opisane są doświadczenia mające na celu określenie wpływu pętli R na transkrypcję *FMRI*.

Moje główne zastrzeżenie dotyczące tej części wyników jest związane z ustaleniem, które struktury obserwowane w kolejnych eksperymentach odpowiadają pętlom R. Pomimo, że wyniki te są opublikowane, detekcja powstawania pętli R *in vitro* zarówno przy użyciu kolistej jak i liniowej matrycy (Ryciny 13 i 14) nie jest jednoznaczna i budzi wątpliwości. W przypadku matrycy kolistej pętla R powodują zmianę migracji formy superskręconej plazmidu do okolicy formy zrelaksowanej (na tle „smiru” widoczne są pogrubione heterogenne prążki, a nie tylko sam „smir”), natomiast trudno powiedzieć jak zmienia się migracja formy liniowej na skutek utworzenia hybrydy z RNA. Na Rycinie 13 w przypadku kolistej matrycy, przy wyższych stężeniach RNazy A „smir” uznany za hybrydy RNA-DNA jest prawie niedostrzegalny i nie ma znaczących różnic między próbkami traktowanymi i nietraktowanymi RNazą H. Wiadomo też, że RNaza A może usuwać RNA także z hybryd RNA-DNA i żeby tego uniknąć należy zwiększyć stężenie soli, co hamuje tę aktywność RNazy A. Warto byłoby sprawdzić jak wyglądają długie i nieterminowane produkty transkrypcji po potraktowaniu tylko DNazą. Dla matrycy liniowej (Rycina 14), aby mieć pewność, że zaobserwowany „smir” faktycznie odpowiada hybrydom RNA-DNA należało zastosować dodatkowe kontrole, np. z matrycą kodującą sekwencję RNA, która nie tworzy tej struktury. Ponadto, dlaczego nie wykonano kontroli tylko w obecności RNazy H, bez traktowania próbek RNazą A? Z kolejnych eksperymentów (Ryciny 17 i m18) wynika, że to raczej specyficzny prążek, który migruje tylko nieco powyżej formy liniowej DNA i znika po traktowaniu RNazą H, jest później uznawany za odpowiadający strukturze pętli R (punkt 11 uwag szczegółowych). Czy można więc uznać, że sam „smir” na Rycinie 16 to nie są pętla RNA, które są po prostu niewidoczne, bo pokrywają się z intensywnym sygnałem pochodzącym od DNA? Czy autorka może zaproponować inne wyjaśnienia dotyczące detekcji pętli R w przeprowadzonych przez siebie doświadczeniach.

Zmodyfikowany protokół wykrywania pętli R został opublikowany w 2022 roku (Kumar and Remus, STAR Protocol, 2022), w którym matryca do *in vitro* transkrypcji jest wycinana z plazmidu z obu stron, w ten sposób wizualizacja formowania pętli R jest ułatwiona. Innym rozwiązaniem byłoby wprowadzenie do konstruktów z matrycą terminatora transkrypcji poniżej sekwencji RNA, co zapobiegłoby powstawaniu długich transkryptów. Pętla R można też lepiej wizualizować w przypadku transkrypcji *in vitro* z użyciem znakowanych nukleotydów, ponieważ sygnał pozostały po usunięciu z reakcji jednoniciowego RNA przez RNazę A odpowiada pętlom R.

Także wzrost transkrypcji $r(\text{CGG})_{100}$ w obecności RNazy H (Rycina 16) nie jest oczywisty, mimo kwantyfikacji, tym bardziej że do normalizacji nie powinien być użyty poziom DNA, ponieważ ilość matrycy ma wpływ na wydajność transkrypcji. Dużo bardziej przekonujący jest wynik podobnego doświadczenia, ale w obecności ASO-CCG.

Pomimo tych zastrzeżeń, interpretacja wyników i podsumowanie tej części wyników są najprawdopodobniej właściwe i faktycznie pętla R mają negatywny wpływ na transkrypcję *in vitro* RNA zawierającego wydłużone powtórzenia, a ten efekt jest redukowany przez działanie ASO-

CCG. Bardzo podoba mi się przedstawiony model nietypowych pętli R powstających podczas transkrypcji wydłużonego regionu powtórzeń *FMRI*, z zaproponowanymi oddziaływaniami pomiędzy strukturami w cząsteczkach RNA i DNA. Czy taka sieć oddziaływań w rejonie powtórzeń CGG była wcześniej postulowana czy są to hipotezy wynikające z badań w grupie prof. Sobczaka?

Druga uwaga dotyczy czynników (RNaz H1 i H2, helikazy DHX9), które zostały wyciszone w celu zaburzenia poziomu pętli R (Ryciny 20 i 21). Czy z danych literaturowych lub doświadczeń przeprowadzonych w laboratorium prof. Sobczaka można wnioskować, że któreś z tych białek usuwa/rozwiąza *in vivo* pętle R w 5'UTR *FMRI* lub dla innych wydłużonych powtórzeń? Z przytoczonych w pracy pozycji literaturowych to bezpośrednio nie wynika. Wyciszenie ekspresji tych białek ma plejotropowy wpływ na wiele procesów, w tym zaburza ogólny przebieg transkrypcji i dojrzewania RNA poprzez ogólną akumulację pętli R. Nie można więc jednoznacznie stwierdzić, że zmiana transkrypcji *FMRI* po wyciszeniu RNazy H1 jest bezpośrednim skutkiem zwiększonego poziomu pętli R dla tego genu. Nie twierdzę, że tak nie jest, ale taki wniosek nie jest w pełni uprawniony. Natomiast wyniki pokazujące wzrost mRNA *FMRI* w obecności ASO-CCG (Rycina 22) są jak najbardziej przekonujące i można wnioskować, że ASO-CCG najprawdopodobniej zaburza pętle R *FMRI*, ponieważ wiążą się bezpośrednio do powtórzeń CGG, i w ten sposób wpływają na transkrypcję *FMRI*.

Dlaczego do zbadania wpływu ASO-CCG na ekspresję *FMRI* użyto pierwotnie tylko linii FX08-01 (Rycina 24), a nie także FX13-01, w której obecna jest niewielka ilość mRNA *FMRI*? Tym bardziej, że w kolejnym eksperymencie widoczny jest wzrost poziomu *FMRI* w linii FX13-01 po traktowaniu ASO-CCG (Rycina 23), zarówno w jądrze jak i w cytoplazmie (Rycina 25). Bardzo ciekawa jest obserwacja, że w przypadku FXS eksport mRNA *FMRI* do cytoplazmy jest zahamowany (Rycina 23). Jaka może być tego przyczyna? Kolejnym interesującym wynikiem jest to, że ASO-CCG może mieć wpływ nie tylko na transkrypcję *FMRI*, ale także na inne aspekty metabolizmu tego RNA, np. transport.

Druga część wyników dotyczy znaczenia elementów *cis* w rejonie 5' UTR *FMRI* dla kanonicznej i niekanonicznej translacji zachodzącej w tym rejonie.

Czy jest jakieś inne, oprócz zmiany ramki odczytu (frameshift), wyjaśnienie obserwacji spadku poziomu białka FRMpolyG w przypadku mutacji niekanonicznego kodonu inicjacji translacji dającego wariant FRMpolyR (Rycina 29)? Ten mechanizm jest odpowiedzialny za powstanie białka chimerycznego, ale w jaki sposób miałby wpływać na ekspresję samego FRMpolyG? Z opublikowanych danych (Wright et al., *NAR*, 2022) wynika, że w przypadku braku translacji FRMpolyR obniżeniu ulega poziom całej puli produktów translacji FRMpolyG (autorzy tej publikacji tego nie komentują), a nie bardzo widzę jak zmiana ramki odczytu może przyczynić się do translacji samego FRMpolyG. Ponadto, nie do końca sensowne wydaje mi się sprawdzenie translacji FRMpolyR w przypadku większej liczby powtórzeń, skoro wcześniejsze badania wykazały, że wariant ten nie jest wykrywalny w takiej sytuacji.

Jakie są wnioski z istnienia wielu potencjalnych uORF w 5'UTR *FMRI*? Czy oprócz przewidzenia takich ramek metodami *in silico* (Rycina 30), ich translacja została jakoś potwierdzona w innych badaniach, także prowadzonych w grupie prof. Sobczaka? Ten rozdział wydaje mi się zbędny i nie wnosi niczego nowego do pracy.

Czym mogą być spowodowane różnice pomiędzy wynikami przedstawionymi w pracy i wcześniej opublikowanymi dotyczące efektów większej liczby powtórzeń CGG na poziom transkrypcji i translacji *FMRI* (Rycina 31)? Autorka w wielu miejscach tłumaczy zaobserwowane efekty obniżoną wydajnością translacji całego *FMRI* na skutek obecności wydłużonych powtórzeń. A jednocześnie kilka razy dyskutuje, że istnieją prawdopodobnie mechanizmy (np. rozwijanie struktury przez helikazy lub reinicjacja translacji na kodonie AUG *FMRI*) pozwalające na wydajną translację przez rejon powtórzeń, nawet do tego stopnia, że poziom FMPR u pacjentów z FXTAS

nie jest szczególnie obniżony. Być może te mechanizmy działają efektywniej w kontekście endogennej *loci FMRI* niż dla konstruktów reporterowych, dlatego w doświadczeniach prezentowanych w pracy obserwowany był znaczący spadek syntezy obu form, FRMP i FRMpolyG?

Z kolei wyniki dotyczące wpływu kontekstu sekwencji Kozak oraz sekwencji niekanonicznego kodonu start na translację FRMpolyG uzyskane przy użyciu Western-blot są zgodne z oczekiwaniami i wydają się wiarygodne (Ryciny 32, 33 i 34), aczkolwiek nieco zastanawiający jest brak spójności z wynikami w systemie NanoLuc dla efektów mutacji kodonu start (wzrost poziomu FRMpolyG wykryty przez Western-blot dla ACG→CUG i ACG→GUG i spadek poziomu w NanoLuc). Natomiast model wyjaśniający inhibicję translacji FRMP w przypadku mutacji ACG→AUG kodonu inicjacji FRMpolyG jest w pełni racjonalny (Rycina 35). Jednak nie do końca zgadzam się z wnioskiem, że korelacja translacji FRMpolyR z efektywnością translacji FRMpolyG (Rycina 36) jest zgodna z efektem zaobserwowanym wcześniej, gdzie translacja FRMpolyR ma wpływ na ekspresję FRMpolyG. To, że translacja białka A ma wpływ na translację białka B w innej ramce odczytu nie oznacza, że spodziewany jest efekt w drugą stronę. Tym bardziej, że ten drugi przypadek jest interpretowany przez autorkę jako skutek zmiany ramki odczytu, co zachodzi w rejonie powtórzeń CGG. Na dodatek w następnym eksperymencie (Rycina 38), przy wprowadzeniu stabilnej struktury drugorzędowej w rejonie inicjacji translacji ACG dla FRMpolyG, spadkowi syntezy FRMpolyG towarzyszy wzrost translacji FRMpolyR, aczkolwiek przyznając, że sytuacja w 5'UTR jest inna i mocno skomplikowana.

Spekulacje na temat braku translacji z dodatkowego niekanonicznego kodonu start w przypadku sekwencji rACG2 na skutek odległości od obecnych w rejonie 5'UTR struktur drugorzędowych (Rycina 36) można by uznać za nieco ryzykowne. Reguły wyboru miejsca inicjacji translacji w przypadku kodonów niekanonicznych są na tyle skomplikowane, że trudno jest czasem poprawnie przewidzieć jakie elementy mają na to wpływ. Jednak wydaje się, że kandydatka posiada dobrą intuicję, ponieważ w tym przypadku przewidywania te okazały się prawdopodobnie słuszne, i kolejna seria eksperymentów polegająca na wprowadzeniu stabilnej struktury drugorzędowej w różnej odległości od miejsca inicjacji translacji ACG dla FRMpolyG (Rycina 38) potwierdziła zależność, że kodony start położone zbyt blisko stabilnej struktury nie są wydajnie rozpoznawane przez rybosom. Interesującą obserwacją jest silne zahamowanie translacji FRMP niezależnie od pozycji wprowadzonej struktury. Nie jest to chyba efektem obniżonej translacji tak zmutowanego mRNA *FRMI*, ponieważ w przypadku mutantów Hairpin14 i Hairpin20 dochodzi do wydajnej syntezy FRMpolyG. Raczej, jak to również proponuje autorka, jest to spowodowane obecnością dwóch struktur o zbliżonej stabilności. Wcześniej wykazała bowiem, że w badanym systemie długość powtórzeń CGG, czyli zwiększona stabilność struktury, ma wpływ na obniżenie translacji FRMP. Nie bardzo jednak rozumiem, dlaczego odległość 16 nt (Hairpin20) pomiędzy kodonem inicjacji ACG a strukturą drugorzędową jest bardziej optymalna dla pozycjonowania rybosomu niż 14 nt (Hairpin 14)? Według publikacji Kozak (PNAS, 1990) i późniejszych badań struktury rybosomu jest to właśnie 14 nt.

Model przedstawiający inicjację translacji zachodzącą w ustrukturyzowanym 5'UTR *FMRI* i wyjaśniający zaobserwowane efekty (Rycina 39) jest dobrym podsumowaniem sformułowanych wniosków, chociaż widzę w nim pewną niespójność. Według modelu najbardziej ustrukturyzowany 5'UTR prowadziłby do ogólnego zahamowania translacji, zarówno FRMpolyG jak i FRMP. Autorka pisze, że najbardziej ustrukturyzowany 5'UTR jest w przypadku Hairpin14, a poprzednie wyniki dla tej struktury wykazały co prawda kompletny brak syntezy FRMP, ale dość silną translację FRMpolyG, natomiast brak produkcji obu białek wystąpił dla Hairpin6, a obniżony dla Hairpin2. Model ten jest jednocześnie dość zabawny, bo przypomina rollercoaster z rybosomami jako wagonikami. Widoczne są w nim pewne uproszczenia, np. znacznie pomniejszony rozmiar

rybosomu w stosunku do struktur RNA, które są przedstawione w nieokreślony sposób, ani jako drugorzędowe struktury ani rozwinięte jednoniciowe RNA.

Dlaczego w doświadczeniu testującym wpływ na translację FRMpolyG dodatkowego łącznika (CALinker) pomiędzy kodonem inicjacji ACG a strukturą tworzoną przez powtórzenia CGG (Rycina 40) nie sprawdzono również poziomu FMRP, który był pokazywany dla innych doświadczeń? Wiem, że nie taki był cel tego eksperymentu, ale odpowiedź mogłaby być interesująca. W przypadku struktury złożonej z 85 powtórzeń efekt spadku syntezy FRMpolyG jest znacznie mniejszy, co autorka, zapewne słusznie tłumaczy jako skutek wzmożonego „kolejkowania” rybosomów przed przeszkodą jaką jest stabilna struktura drugorzędowa. Jednak odległość do niekanonicznego kodonu start wynosi 35 nt, co nie jest optymalnym dystansem dla pozycjonowania rybosomu w tym mechanizmie. Czy tym można uzasadnić dwukrotny spadek translacji FRMpolyG w porównaniu z WT, czy jakimś innym czynnikiem? Autorka nie wyjaśnia bezpośrednio dlaczego oczekiwany jest spadek produkcji FRMpolyG, można się tego domyślać z poprzednich wzmianek.

Ostatnie doświadczenie przedstawione w pracy polegało na testowaniu translacji w obecności dwóch ASO, które oddziałują z różnymi fragmentami 5'UTR *FMRI* (Rycina 41). Wyniki są raczej niespójne i trudne do wyjaśnienia. Co prawda w przypadku ASO1 można zaobserwować wzrost translacji FRMpolyG, ale znaczący tylko w przypadku krótkich powtórzeń CGG, natomiast działanie ASO3 jest trudne do interpretacji, być może jest wynikiem kombinacji nieoptymalnej odległości kodonu stop od struktury RNA, jak to zresztą sugeruje autorka, i spadkiem liczby powtórzeń CGG w tej strukturze, która staje się mniej stabilna i w mniejszym stopniu może zatrzymać rybosomy. Jednak zaproponowane w pracy rozwiązania tych rozbieżności nie są do końca przekonujące, ja też nie potrafię zaoferować sensownego wyjaśnienia. Kolejna wątpliwość, dlaczego w tym doświadczeniu sprawdzono poziom endogennego FMRP? Czy zastosowane konstrukty były inne i FMRP nie było wyrażane w fuzji ze znacznikiem FLAG?

Podsumowując, zaprezentowane w tej części wyników doświadczenia są bardzo wymagające i pracochłonne. Ponadto, mają kompleksową naturę i wiele nieprzewidzianych czynników może wpływać na otrzymane rezultaty, które nie zawsze dostarczają jednoznacznych odpowiedzi, dlatego ich interpretacja może przysparzać niejakich trudności. Uważam, że mimo pewnych niedociągnięć, mgr Niewiadomska dobrze poradziła sobie z tym niełatwym zadaniem.

Dyskusja.

Autorka sprawnie podsumowuje uzyskane wyniki i omawia wnioski w szerszym kontekście wcześniej opublikowanych badań. Przedstawia też kompleksowość i zróżnicowanie możliwych molekularnych podstaw zmian ekspresji *FMRI* w przypadku występowania wydłużonych powtórzeń, a jednocześnie proponuje dalsze eksperymenty, które pozwolą na wyjaśnienie rozbieżności czy potwierdzenie niepewnych wyników. Niektóre uwagi i koncepcje są naprawdę wnikliwe i świadczące o dużym zaangażowaniu w tematykę badań. Ciekawa jest na przykład hipoteza, że w rejonie 5'UTR *FMRI* powstają dwa rodzaje pętli R, które mogą w przeciwstawnym sposób regulować transkrypcję tego genu. Innym zajmującym aspektem jest przedstawienie potencjalnego udziału pętli R w przejściu *loci FMRI* ze stanu aktywnego do wyciszonego. Zainteresował mnie też obszerny opis testów z zastosowaniem inhibitorów lub systemów modyfikacji genomu (np. CRISPER-Cas) mających na celu przywrócenie ekspresji FRMP wyciszonej przez obecność wydłużonych powtórzeń CGG. Wydaje się, że w obecnym stadium zastosowanie w tym celu ASO kierowanych na powtórzenia CGG w FXS nie jest obiecującym podejściem, ze względu na brak syntezy FRMP mimo podwyższenia poziomu *FMRI*, co może być, jak sama autorka zauważa, spowodowane zahamowaniem eksportu zmutowanego mRNA do cytoplazmy i/lub niską wydajnością translacji tej cząsteczki.

Autorka słusznie zauważa, że analiza wpływu różnych elementów *cis* w 5'UTR *FRMI* na translację powinna być w również przeprowadzona dla konstruktów wyrażanych pod natywnym promotorem. Ciekawe, czy i na ile wyniki uzyskane w takim układzie byłyby odmienne? Równie trafne są rozważania dotyczące przyczyn sprzecznych wyników uzyskanych innymi metodami i w różnych systemach. Natomiast dyskusja wpływu kontekstu Kozak i sekwencji kodonu start na niekanoniczną translację wydaje się zbyt rozwlekła i szczegółowa, tym bardziej że wyniki te są dość jednoznaczne. Ważnym czynnikiem modulującym efektywność translacji *FMRI* jest obecność struktur RNA i ich odległość od niekanonicznych kodonów inicjacji. Ten aspekt jest wnikliwie omówiony w sposób spójny i w miarę przystępny sposób. Niestety interpretacja wyników działania ASO1 i ASO3 rozpoznających sekwencje okalające powtórzenia CGG jest mocno utrudniona nakładającym się wpływem różnych czynników, wydaje się, że rybosomy mogą sobie robić co chcą niezależnie od tego jakie mamy wobec nich plany, czasem o ich zachowaniu bardziej decyduje dystans, innym razem stabilność struktur RNA czy podatność do tworzenia kolejek.

Dyskusja jest zajmująca i porusza zagadnienia istotne dla przeprowadzonych badań, ale jest też zbyt obszerna, a miejscami zagmatwana. Także zbyt skomplikowane i czasem wadliwie zbudowane zdania nie ułatwiają odbioru treści. Uważam, że można było uniknąć zbędnych powtórzeń, uprościć niektóre kwestie, a przede wszystkim przedstawić całość w bardziej przejrzystej i skondensowanej formie. Natomiast godne pochwały jest to, że każda z części dyskusji jest zakończona krótkim podsumowaniem, które jest użyteczne, trafne i zwięzłe.

Należy zaznaczyć, że tematyka pracy mgr Niewiadomskiej jest bardzo rozległa a badane przez nią procesy translacji RNA wyjątkowo skomplikowane. Dlatego powyższe uwagi krytyczne nie mają znaczącego wpływu na wysoką ocenę całości pracy, zarówno części teoretycznej jak i eksperymentalnej. Podsumowując, rozprawa przedstawiona przez mgr Darię Niewiadomską jest na wysokim poziomie i świadczy o dojrzałości, wiedzy i dużej sprawności eksperymentalnej autorki.

Rozprawa spełnia ustawowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim, wnioskuje zatem do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne UAM o dopuszczenie pani mgr Darii Niewiadomskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Uwagi szczegółowe:

1. Strona 23. „with the degree of cytosine methylation within the *FMRI* 5'UTR” Metylacje znajdują się w części genu kodującym 5' UTR mRNA *FRMI*, a nie w samym 5'UTR, który jest rejonem mRNA.
2. Strona 25. Należało wspomnieć, że w przeciwieństwie do DGCR8, nadekspresja DROSHA, podobnie jak Sam68, nie odwracała fenotypu toksyczności powtórzeń CGG.
3. Niektóre części wstępu są zbyt szczegółowe, wydaje mi się zbędne przytaczanie konkretnych eksperymentów (np. wyniki eksperymentu FISH czy RT-PCR na stronie 25) lub drobiazgowy opis niektórych przypadków (mysie modele FXTAS).
4. Strona 27. Stwierdzenie “RAN translation of CGG repeats can occur in all possible ORFs of a transcript” jest nie do końca właściwe. Jak wiadomo skrót ORF oznacza Open Reading Frame, a translacja odbywa się w określonej ramce odczytu („reading frame”) a nie otwartej ramce odczytu.
5. Strona 27. Odwoływanie się w wielu miejscach tekstu do znacznie dalej umieszczonej Ryciny 26a jest kłopotliwe. Osobna rycina przedstawiająca schemat locus *FMRI* z zaznaczeniem transkryptów sensownego i antysensownego oraz potencjalnych produktów białkowych powstających z obu cząsteczek mRNA powinna się znaleźć na stronie 27.

Poza tym, informacje dotyczące liczby powstających toksycznych wariantów są mylące. Najpierw we wstępie autorka pisze, że translacja RAN generuje sześć produktów, a następnie w wynikach w opisie Ryciny 26a, stwierdza, że z mRNA *FMRI* powstają 4 białka, w tym jedno kanoniczne FMRP

i trzy dodatkowe warianty RAN, chociaż na samej rycinie jest ich pięć, ponieważ powstają dwa białka FMRpolyG (nawet jeśli ekspresja jednej proteoformy jest przeważająca) z dwóch różnych miejsc inicjacji translacji, w tej samej ramce odczytu, ale różniące się wielkością. Na Rycinie 2 wymienione są trzy produkty RAN, FMRpolyG, FMRpolyA i FMRpolyR, mimo, że dwa z powstających z antysensownego transkryptu, ASFMRpolyP i ASFMRpolyA zostały wykryte w agregatach komórkowych. Nawet jeśli nie wszystkie warianty zostały do tej pory wykryte, to nie znaczy, że nie są produkowane w konkretnych warunkach.

6. Strona 37. Zostały opisane regulatorowe funkcje pętli R, ale brakuje krótkiego rozdziału o szkodliwym wpływie tych struktur na stabilność genomową nie związaną z powtórzeniami, np. na skutek konfliktu między transkrypcją i replikacją czy powstawaniem uszkodzeń DNA indukowanych przez pętle R podczas transkrypcji.

7. Strona 38. Podpis Ryciny jest zbyt obszerny i zawiera informacje niepasujące do opisu Ryciny. Także wiele innych podpisów Rycin (np. 12, 13 i następne) są nadmiernie opisowe i zawierają niepotrzebne informacje techniczne (warunki reakcji).

8. Strony 39 i 41. Pojawiają się sprzeczne stwierdzenia „DNA methyltransferases poorly bind to RNA:DNA hybrids” i „R-loops may recruit specific chromatin modifiers”. Czy można to jakoś wyjaśnić?

9. Strona 74, Rycina 13. Dlaczego w przypadku zastosowania wysokich stężeń RNazy A (25 i 50 ng/μl) widoczne są znaczne ilości wolnego RNA po potraktowaniu RNazą H ale nie bez traktowania?

10. Strona 76/77, Rycina 15. Na Rycinie wybrane stężenie RNazy H to 10 U (zapewne na całą reakcję w objętości 10 μl), w tekście jest to 1 U/μl, należało użyć tych samych jednostek.

11. Strona 79, Rycina 17. Które dokładnie prążki czy obszary odpowiadają strukturom R-loop/ASO-CCG-Cy3? Czy tylko te zaznaczone czarną strzałką? Wcześniej uznano, że to „smir” odpowiada pętli R, jeśli tak, to powinny hybrydyzować z ASO-CCG-Cy3 na całej długości? Po traktowaniu RNazą A i usunięciu wolnego RNA zostaje jakiś „smir” powyżej strzałki, czy to też R-loop/ASO-CCG-Cy3? Z kolejnej Ryciny 18 wynika, że za R-loop/ASO-CCG-Cy3 uznaje się specyficzny prążek a nie cały zakres „smiru”. Wynik przedstawiony na Rycinie 18 jest znacznie bardziej przekonujący niż na Rycinie 17. Autorka nie powinna jednak twierdzić, że po usunięciu pętli R przez cięcie RNazą H wzrasta transkrypcja rCGG₁₀₀, ponieważ w tym eksperymencie mierzy poziom hybrydy DNA-template/rCGG₁₀₀, a nie bezpośrednio poziom powstałego transkryptu. To powinno być wspomniane w pracy. Poziom rCGG₁₀₀ jest bezpośrednio wyznaczony w doświadczeniu na Rycinie 16, i jego wzrost jest dobrze widoczny w obecności ASO-CCG.

12. Strona 88, Rycina 22. W przypadku komórek CGG^{norm}/(1) wyciszenie ekspresji RNazy H1 jest dużo słabsze, więc wyniki dla tego eksperymentu nie są miarodajne.

13. Strona 91, Rycina 23. Szkoda, że transkrypt *FMRI* nie jest wykrywany przy użyciu RT-PCR w linii FX13-01 przed traktowaniem 5-azadC, zapewne z powodu zbyt małej ilości materiału (także poziom kontroli GAPDH jest niski).

14. Strony 94-95, Rycina 25. W opisie tego doświadczenia nie jest wspomniane, że komórki FX13-01 oprócz ASO-CCG były także traktowane 5-azadC, jest to napisane dopiero w podsumowaniu tej części wyników. Czy bez 5-azadC poziom *FMRI* po działaniu ASO-CCG nie zmieniał się? Czy po prostu poziom *FMRI* bez aktywacji 5-azadC jest tak niski, że trudno analizować jego zmiany?

15. Strona 97. Autorka nie powinna nazywać tego rozdziału „Development of NanoLuciferase reporter assay...”, ponieważ podobne metody, również z zastosowaniem Nluc, były wcześniej stosowane. To nie samo podejście było opracowane, a raczej zaprojektowane konstrukty reporterowe, a podejście użyte w pracy zmodyfikowane i dostosowane do potrzeb zaplanowanych doświadczeń.

16. Strony 97-99. Opis konstruktów użytych do detekcji produktów translacji konstruktów reporterowych jest niejasny. W tekście pojawiają się produkty FRMP-Nluc-FLAG (AUG +0), FMRpolyG (ACG +0) i FMRpolyG-Nluc-FLAG (ACG +1 i GUC +1 (później zmutowany)). Na Rycinie 26b widzimy FRMP-Nluc-FLAG i FMRpolyG-Nluc-FLAG oraz FMRpolyR-Nluc-FLAG, o którym nie było mowy, a który pojawia się na stronie 101. Na Rycinie 26C i w jej opisie jest epitop 9FM, ale bez wystarczającego wyjaśnienia, jest to wspomniane na następnej stronie przy omawianiu wyników, a wcześniej w Materiałach i metodach. Epitop ten nie jest też uwzględniony na kolejnych Rycinach. Konstrukty użyte w pracy są wystarczająco skomplikowane, a ich niedokładny opis powoduje dodatkowe zamieszanie.

17. W podpisach do Rycin przedstawiających wyniki eksperymentów z wykorzystaniem systemu podwójnej lucyferazy brakuje informacji, że aktywność Nluc była normalizowana względem Fluc. Jest to opisane w Materiałach i metodach, ale dla ułatwienia powinno być także wspomniane w podpisach do Rycin.

17. Strona 120. Zdanie „The quantification of signal intensities suggested that localization of the ACG (+1) codon within the rACG1 mutant was very effective since the level of FMRpolyG was twice as high as in the control.” jest bardzo niejasne.

18. Strona 120, Rycina 36C. Czy przeliczenie sygnału Western-blot dla FMRpolyG było wykonane dla produktu powstającego z nowego kodonu rACG1(+1) czy naturalnego ACG(+1)? Nie jest to wspomniane w opisie do Ryciny.

19. Strona 128, Rycina 41. Na Rycinie użyto skrótu SCR co prawdopodobnie oznacza to samo co wcześniej zastosowany skrót ASO-Ctrl, ale nie wyjaśniono tego terminu, który jest mniej oczywisty niż ASO-Ctrl. W Tabeli 15 znajduje się sekwencja ASO-Scr, ale powinno to być wspomniane w podpisie do Ryciny 41.

20. Strony 129-130, Rycina 42. Autorka pisze, że dystans pomiędzy kodonem ACG a sekwencją RNA oddziałującą z ASO1 wynosi 22 nt, jak ta odległość została policzona?, na Rycinie 42 między ACG a początkiem ASO1 jest 9 nt, 22 nt przypada na środek ASO1.

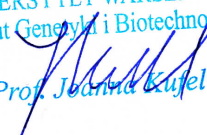
21. Strona 138, Rycina 43. Włączanie dodatkowych wyników do Dyskusji nie jest właściwe i powoduje naruszenie jej ciągłości.

22. Strona 144. Jeśli hipoteza *iii)* jest słuszna, czy nie zaobserwowano by powstawania chimerycznego białka o innej wielkości niż FMRpolyR i FMRpolyG?

23. Błąd w spisie literatury, prawdopodobnie powstały podczas formatowania.

Pozycja 15. Parus, J. L., Kuc, G. & Kierzek, J. Determination of lead and silver in copper blister by isotope excited X-ray fluorescence. *J. Radioanal. Chem.*

24. Nie jestem zwolennikiem częstego używania w tekście różnych kolorów czcionki lub czcionki pogrubionej w celu zwrócenia uwagi czytelnika lub podkreślenia wagi omawianych kwestii. Moim zdaniem to bardziej rozprasza niż skupia. No ale to bardziej kwestia gustu.

UNIWERSYTET WARSZAWSKI
Instytut Genetyki i Biotechnologii

Prof. Joanna Kufel

Prof. Joanna Kufel