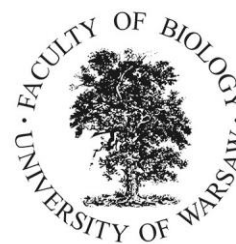




UNIVERSITY
OF WARSAW

Faculty of Biology
Department of Animal Physiology
Magdalena Dziembowska, PhD



13 sierpnia 2024

Recenzja pracy doktorskiej mgr Katarzyny Tutak pt.

“Identyfikacja nowych modyfikatorów niekanonicznej biosyntezy toksycznego białka poliglicynowego ze zmutowanego mRNA FMR1”.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr **Katarzyny Tutak** została wykonana pod kierunkiem prof. dr. hab. Krzysztofa Sobczaka oraz dr inż. Anny Baud w Instytucie Biologii Molekularnej i Biotechnologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Mutacja dynamiczna w genie FMR1, w niekodującym obszarze 5'UTR, prowadzi do akumulacji różnej ilości powtórzeń CGG których liczba może wahać się od kilkudziesięciu do kilku tysięcy. Jest to przyczyną wystąpienia zespołów genetycznych takich jak: zespół drżenia i ataksji związany z łamliwym chromosomem X (FXTAS), przedwczesne wygasanie funkcji jajników związane z zespołem łamliwego chromosomu X (FXPOI), w obydwu przypadkach liczba powtórzeń CGG wynosi pomiędzy 55 a 200. Zespół łamliwego chromosomu X występuje kiedy liczba powtórzeń CGG przekroczy 200.

W swojej pracy doktorskiej mgr **Katarzyna Tutak** zidentyfikowała białka oddziałujące z mRNA FMR1 zawierającym ciąg powtórzeń CGG charakterystyczny dla wystąpienia zespołu FXTAS, w którym powstaje nie tylko zmutowane mRNA, ale także dochodzi do niekanonicznej syntezy białka z traktami poliglicynowymi. Obydwie zmutowane cząsteczki mogą być toksyczne dla komórki.

Praca jest napisana w języku angielskim, ma nietypową budowę i składa się ze Wstępu, a następnie publikacji przeglądowej pt. „Partners in crime: Proteines implicated in RNA repeat expansion diseases”, której doktorantka jest współautorką. Następnie praca zawiera

manuskrypt opublikowany wstępnie na platformie BioRxiv, którego Pani Katarzyna Tutak jest pierwszą autorką. Dalej następują oświadczenia współautorów pracy i ostatnia część podsumowująca nieopublikowane jeszcze wyniki. Bibliografia do tej części zawiera 148 cytowań. Jako osobne rozdziały zostały wydzielone Cel pracy oraz Podsumowanie i wnioski. Praca zawiera wymagane streszczenie w języku angielskim i polskim.

We **Wstępie** Autorka wprowadza czytelnika w tematykę pracy opisując aktualny stan wiedzy na temat molekularnego podłoża zespołów genetycznych związanych z wystąpieniem mutacji dynamicznej w genie FMR1. Częścią Wstępu jest obszerna praca przeglądowa, której doktorantka jest współautorką Oświadczenia współautorów artykułu wskazują, że autorka pracy zredagowała rozdziały RAN translation i RBPs as potential therapeutic strategies. Praca skupia się na opisie roli wybranych białek wiążących RNA, które oddziałują ze zmutowanym mRNA zawierającym ekspansję powtórzeń sekwencji nukleotydów w tzw. Repeat Expansion Disorders (REDs). Praca przeglądowa jest imponująco obszerna, zawiera ogromną tabelę z listą białek zaangażowanych w patomechanizm chorób z grupy REDs, niezwykle czytelne ryciny i dużą ilość cytowań.

Wyniki składają się z 2 części, pierwsza to gotowy manuskrypt z rycinami i bibliografią zatytułowany „Ribosomal composition affects the noncanonical translation and toxicity of polyglycine-containing proteins in fragileX-associated conditions”. Druga część opisuje nieopublikowane jeszcze wyniki badań Autorki.

Powstawanie toksycznego białka FMRP zawierającego trakty poliglicynowe jest możliwe dzięki niezależnemu od kodonu ATG procesowi niekanonicznej translacji, tzw. RAN translation. Poznanie białek zaangażowanych w oddziaływanie z cząsteczkami mRNA zawierającymi powtórzenia CGG było celem Autorki pracy. Aby go osiągnąć wykorzystwała spektrometrię mas w tym metody ilościowe. Spośród zidentyfikowanych białek do dalszych analiz wybrano 10 kandydatów, z czego szczególnie interesująca okazała się RPS26 wchodzące w skład małej podjednostki rybosomu. Wyciszenie ekspresji RPS26 w komórkach skutkowało zmniejszeniem ilości białka poliglicynowego w kilku niezależnie testowanych przez Autorkę modelach. Co ciekawe białko opiekuńcze dla RPS26, TSR-2 pozytywnie wpływało na syntezę FMRpolyG. Kolejną podjednostką rybosomu zaangażowaną w RAN translację okazało się być białko RPS25. W części pracy opisującej zmiany proteomu w zależności od poziomu białka RPS26 (Fig.3 A) Autorka zidentyfikowała w sumie 381 białek

o zmienionej ekspresji komentując ten wynik jako niewielką zmianę. Moim zdaniem 20% zmianę można uznać za znaczącą.

Badania opisane w pracy są bardzo dobrze zaplanowane i przeprowadzone z należytą starannością i troską o odpowiednie kontrole. Wyniki są niezwykle ciekawe z biologicznego punktu widzenia, wiedza na temat specyficznych substratów dla rybosomów o różnym składzie podjednostek jest fragmentaryczna. Przedstawione wyniki wskazują na to że skład małej podjednostki rybosomu ma znaczenie dla regulacji procesu RAN translacji. Mam tutaj jedno pytanie do dyskusji przez Doktorantkę. Czy użycie do przeprowadzonych doświadczeń pełnej sekwencji mRNA FMR1 z powtórzeniami CGG zamiast samego fragmentu 5'UTR mogłoby mieć wpływ na uzyskane wyniki? Czy Autorka rozważała przeprowadzenia takiego eksperymentu?

W kolejnej części pracy Autorka opisuje wyniki uzyskane z wykorzystaniem alternatywnego sposobu przygotowania próbek do spektrometrii mas. W wyniku tych doświadczeń udało się scharakteryzować kolejne białka oddziałujące z sekwencjami CGG RNA, tym razem istotność statystyczną dało się osiągnąć jedynie dla 5 białek znacząco wzbogaconych dla FMR1 RNA. Autorka pracy w dalszych analizach nie eksploruje jednak roli tych białek, co wydaje mi się nielogiczne. Skupia natomiast swoją uwagę na helikazach DHX15 i DDX21 oraz białku ALYREF. Dlaczego spośród 155 zidentyfikowanych białek zostały wybrane właśnie te? Kolejne pytanie dotyczy białka RPS26, czy było w tym zestawie danych choćby w niewielkim stopniu wzbogacone (np. na granicy istotności statystycznej), oraz czy któreś ze zidentyfikowanych 5 białek było wzbogacone w pierwszej analizie z proteolitycznym trawieniem za złożu?

Sekcja **Materialy i Metody** jest dostatecznie wyczerpująca, a jednocześnie odpowiednio zwięzła i nie mam do niej uwag krytycznych. Praca jest bogata metodycznie i widać że do jej wykonania autorka musiała opanować zaawansowane metody hodowli i transfekcji komórek, wyprowadzania stabilnych linii komórkowych a także zaawansowane metody biologii molekularnej i proteomiki. Na szczególną uwagę zasługuje zaawansowana metoda przygotowania próbek do analizy proteomicznej.

Krótką **Dyskusja** drugiej części wyników jest sprawnie napisana i świadczy o dojrzałości naukowej Autorki. Podsumowując, analiza i dyskusja uzyskanych wyników dowodzą, że Doktorantka potrafi nie tylko właściwie zaplanować eksperymenty i zastosować

odpowiednie techniki do ich wykonania, ale także prawidłowo zinterpretować dane eksperymentalne, porównać z wynikami uzyskanymi przez innych oraz zaproponować prawdopodobny mechanizm badanych zjawisk.

Przedłożona mi do oceny **rozprawa doktorska mgr Katarzyny Tutak prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki biologiczne**. Uzyskane przez Autorkę pracy wyniki są oryginalne i opisują odkrycie białek wiążących zmutowaną cząsteczkę mRNA FMR1, są to RPS26 i RPS25, składniki małej podjednostki rybosomu oraz związane z ich dojrzewaniem białko TSR2 a także helikazy DHX15 i DDX21 i białko ALYREF, związane z transportem mRNA z jądra komórkowego do cytoplazmy. W związku z tym w mojej ocenie **przedstawiona rozprawa doktorska spełnia kryterium oryginalnego rozwiązania problemu naukowego**. Ponadto na podstawie zaprezentowanych w rozprawie wyników badań mogę stwierdzić, że **Doktorantka wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej**.

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona mi do oceny praca doktorska mgr **Katarzyny Tutak** spełnia wszystkie warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. z poprawkami wprowadzonymi Ustawą z dnia 18 marca 2011 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2016 r. poz.882). Dlatego też zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr **Katarzyny Tutak** do dalszych etapów przewodu doktorskiego i popieram wnioski o nadanie jej stopnia naukowego doktora.

Biorąc pod uwagę olbrzymi nakład pracy i oryginalność uzyskanych wyników, które z pewnością zostaną opublikowane w czasopiśmie o szerokim zasięgu wnioskuję o przyznanie wyróżnienia pracy doktorskiej Pani **Katarzyny Tutak**.

dr hab. Magdalena Dziembowska, prof. ucz



Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego