

Poznań, 07.08.2024

Prof. dr hab. Marta Olejniczak

Zakład Inżynierii Genomowej

ICHB PAN

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Tutak
z tytułem**

**„Identification of novel modifiers of noncanonical biosynthesis of toxic polyglycine
protein from mutant *FMRI* mRNA”**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana w Zakładzie Ekspresji Genów Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii UAM w Poznaniu pod kierunkiem prof. dr. hab. Krzysztofa Sobczaka oraz promotora pomocniczego dr inż. Anny Baud. Ogólna tematyka badań dotyczy lepszego zrozumienia molekularnych podstaw patogenezy chorób wywoływanych ekspansją krótkich powtórzeń tandemowych CGG w genie *FMRI*. W swojej pracy mgr Katarzyna Tutak skupiła się na procesie tzw. RAN (repeat-associated non-ATG) translacji, która prowadzi do powstawania toksycznych białek, zawierających ciągi monoaminokwasowe kodowane przez sekwencję powtórzoną. Takie białka mają tendencję do agregacji, co w konsekwencji prowadzi do degeneracji komórek. Długość ciągu CGG w regionie 5'UTR genu *FMRI* wpływa na występowanie różnego typu stanów chorobowych. W swoich badaniach Autorka wykorzystwała model z premutacją w genie *FMRI* (99 powtórzeń CGG), związany z występowaniem zespołu drżenia i ataksji związanego z łamliwym chromosomem X (FXTAS) oraz zespołu przedwczesnego wygasania funkcji jajników (FXPOI). RAN translacja, jest obok toksyczności RNA i uszkodzeń DNA wywoływanych obecnością struktur typu pętli R, jednym z trzech postulowanych mechanizmów patogenezy tych chorób.

Celem badań Pani mgr Katarzyny Tutak było poszukiwanie nowych modyfikatorów procesu niekanonicznej biosyntezy toksycznych białek poliglicynowych na mRNA *FMRI*. Cele szczegółowe obejmowały (i) identyfikację białek oddziałujących z regionem 5'UTR

genu *FMRI*, zawierającym wydłużony ciąg CGG przy użyciu spektrometrii mas, (ii) walidację właściwości regulatorowych wybranych kandydatów w modulowaniu procesu RAN translacji poprzez wyciszenie ich ekspresji oraz (iii) zbadanie mechanizmu regulacji RAN translacji dla wybranych kandydatów.

Wyznaczone przez Doktorantkę cele są ambitne i nowatorskie i większość z nich została w pełni zrealizowana. W związku z brakiem wiedzy na temat mechanizmów odpowiedzialnych za regulację procesu RAN translacji, podjęcie tej tematyki jest uzasadnione. Badania te są również ważne w świetle poszukiwania potencjalnych terapii dla wciąż nieuleczalnych chorób wywoływanych ekspansją sekwencji powtórzonych. W przypadku wielu z nich RAN translacja jest istotnym elementem patogenezy.

Rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Tutak nie ma tradycyjnego układu. Początek pracy zawiera spis treści, wykaz skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim, wstęp oraz cel badań. Zamiast zwięzłego przedstawienia wyników badań w formie autoreferatu Autorka zamieściła w kolejnej części dwie publikacje naukowe (praca przeglądowa z WIREs RNA oraz preprint z BioRxiv) wraz z oświadczeniami współautorów o ich udziale w powstaniu tych prac. W kolejnym rozdziale opisane zostały nieopublikowane wyniki badań z podziałem na rezultaty, dyskusję oraz materiały i metody, oraz spis 148 pozycji literaturowych. Pracę wieńczy bardzo krótki rozdział Uwagi końcowe. W mojej opinii, rozprawa doktorska powinna zawierać syntetyczny opis wyników badań Autorki w kontekście postawionych celów, a manuskrypt wieloautorskiej publikacji powinien stanowić załącznik do Autoreferatu. Podobnie, odniesienie do pracy przeglądowej powinno dotyczyć jedynie dwóch rozdziałów przygotowanych przez Autorkę.

Wstęp jest bardzo ciekawym i wartościowym wprowadzeniem do tematyki badań. Doktorantka wyjaśniła w nim związek ekspansji sekwencji mikrosatelitarnych z chorobami człowieka, ze szczególnym uwzględnieniem niestabilności powtórzeń CGG w genie *FMRI*. Opisała trzy główne mechanizmy odpowiedzialne za rozwój i progresję stanów chorobowych związanych z premutacją w genie *FMRI* (FXPAC). Jednym z tych procesów jest opisana ponad 20 lat temu RAN translacja, niekanoniczny sposób biosyntezy białka bez udziału kodonu start AUG. Zgodnie z zaproponowaną wcześniej hipotezą, struktura spinki tworzona przez wydłużone ciągi CGG w transkrypcie *FMR1* utrudnia skanowanie kompleksu inicjującego translację i wpływa na wybór niekanonicznych kodonów start. W wyniku tego procesu powstają głównie białka poliglicynowe. W dalszej części Wstępu Autorka przedstawiła stan

wiedzy na temat regulacji procesu RAN translacji. Opisała potencjalne mechanizmy prowadzące do toksyczności białek RAN oraz rolę zmutowanego RNA FMR1 w tworzeniu inkluzji wewnątrzjądrowych. Rozdział ten kończy się opisem znaczenia heterogenności rybosomów w regulacji procesu RAN translacji. Dodatkowym źródłem informacji na temat roli toksycznego RNA oraz RAN translacji w patogenezie chorób związanych z ekspansją sekwencji mikrosatelitarnych jest obszerna praca przeglądowa opublikowana w czasopiśmie WIREs RNA. Katarzyna Tutak jest jedną z trzech pierwszych równorzędnych autorów tej pracy. Zgodnie z oświadczeniami współautorów udział mgr Katarzyny Tutak polegał m.in. na przygotowaniu rozdziałów: *RAN translation* oraz *Targeting RBPs as potential therapeutic strategies*. Zarówno Wstęp Autorefereatu jak i publikacja przeglądowa świadczą o znakomitym przygotowaniu teoretycznym Doktorantki do prowadzenia badań.

Kolejną częścią przedstawionej do oceny rozprawy jest manuskrypt publikacji eksperymentalnej pt. *Ribosomal composition affects the noncanonical translation and toxicity of polyglycine-containing proteins in fragile X-associated conditions*, w którym mgr Katarzyna Tutak jest pierwszym autorem i zgodnie z oświadczeniami współautorów pracy wykonała w nim większość eksperymentów. Celem badań było poszukiwanie modyfikatorów procesu RAN translacji poprzez identyfikację białek wiążących się do zmutowanego RNA genu *FMR1* za pomocą spektrometrii mas. Eksperyment był prowadzony w komórkach HEK293T z ekspresją 5'UTR genu *FMR1* zawierającego 99 powtórzeń CGG oraz aptamery MS2, służące do znakowania docelowego RNA. Zidentyfikowano ponad 150 białek związanych z procesami biogenezy rybosomów, translacją i regulacją metabolizmu mRNA. Wśród nich 32 białka wykazywały istotne wzbogacenie w porównaniu do kontroli. Wyciszenie ekspresji dwóch zidentyfikowanych genów kodujących helikazę DHX15 i białko rybosomalne RPS26 wpływało na RAN translację poprzez obniżenie poziomu białka poliglicynowego (FMRpolyG), a w przypadku RPS26 dodatkowo zmniejszało ilość agregatów i poprawiało żywotność komórek. Co ciekawe, analizy w modelach komórkowych ze stałą ekspresją fragmentu genu *FMR1* wykazały, że RPS26 wpływa na RAN translację niezależnie od długości ciągu CGG. Nie wpływa również na kanoniczną translację i poziom białka FMRP. Przy wykorzystaniu metody SILAC-MS Autorka wykazała, że obniżenie poziomu białka RPS26 wpływa na niewielką liczbę białek komórkowych. Ich cechą wspólną jest wzbogacenie w nukleotydy GC w sekwencjach 5'UTR mRNA kodujących te białka. Białko RPS26 jest składnikiem podjednostki 40S rybosomu. Aby lepiej poznać mechanizmy regulatorowe RAN translacji zależnej od białka RPS26, Autorka zbadała wpływ białka

opiekuńczego (chaperonu) TSR2 oraz innego składnika podjednostki 40S, białka RPS25 na ten proces. Wykazała, że zarówno TSR2 jak i RPS25 modulują produkcję FMRpolyG i jego toksyczność. Wyniki te sugerują, że skład podjednostki 40S odgrywa istotną rolę w niekanonicznej translacji RAN związanej z ekspansją powtórzeń CGG w genie *FMR1*.

Kolejna część pracy zawiera nieopublikowane rezultaty badań, mających na celu charakterystykę innych czynników, wpływających na niekanoniczną syntezę białek poliglicynowych ze zmutowanego mRNA *FMR1*. Wielkoskalowe analizy proteomiczne często wiążą się z wieloma problemami, takimi jak wybór metody przygotowania próbek, wybór odpowiedniej kontroli eksperymentu, zanieczyszczenia próbki, brak detekcji białek występujących w niewielkich ilościach w komórce, itp. Ponieważ na wynik takiej analizy wpływa wiele czynników zwykle nie dają one jasnej odpowiedzi na postawione pytanie. Dlatego bardzo pozytywnie oceniam powtórzenie przez Autorkę analiz proteomicznych w poszukiwaniu istotnych modyfikatorów RAN translacji. Zmodyfikowana metoda przygotowania próbek do analizy MS ujawniła 5 białek istotnie wzbogaconych w porównaniu do kontrolnego RNA. Nie były one dalej badane, dlaczego? Do dalszej analizy Autorka wybrała inne zidentyfikowane białka, helikazę DDX21 oraz białko ALYREF, które na podstawie ich funkcji mogą być zaangażowane w proces RAN translacji. Wyciszenie DDX21 wpływało na obniżenie poziomu białka poliglicynowego w modelach komórkowych z przejściową i stabilną ekspresją 5'UTR *FMR1*. Jednocześnie poziom kanonicznego białka FMRP nie zmieniał się. Wyniki dotyczące ALYREF są trudne do interpretacji (zmiany nieistotne statystyczne) i jak pisze Autorka niezbędne jest powtórzenie eksperymentów. Ostatni rozdział jest ciekawym i wartościowym porównaniem wyników dwóch analiz proteomicznych, różniących się sposobem przygotowania próbek. Wśród 67 białek wspólnych dla tych dwóch podejść znalazły się białka wcześniej opisywane w kontekście RAN translacji oraz białko RPS26. Zgadzam się z Autorką, że zidentyfikowane białka są bardzo cennym źródłem informacji dla przyszłych badań nad patogenezą chorób wywoływanych premutacją w genie *FMR1*.

Podsumowując, badania przedstawione w ramach rozprawy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Tutak dotyczą ważnego problemu naukowego i przybliżają nas do poznania molekularnych podstaw procesu RAN translacji. Wśród najważniejszych osiągnięć Doktorantki można wymienić identyfikację nowych modyfikatorów procesu RAN translacji, w tym małego białka rybosomowego RPS26, które jest zaangażowane w biosyntezę niewielkiej grupy białek bogatych w sekwencje GC w regionach 5' nieulegających translacji.

Bardzo ważnym wynikiem badań jest również lista 67 białek wiążących się do toksycznego mRNA FMR1, wyłoniona na podstawie dwóch analiz proteomicznych. Przedstawione wyniki sugerują, że skład podjednostki 40S rybosomu ma wpływ na proces RAN translacji i powstawanie białek poliglicynowych. Badania mgr Katarzyny Tutak charakteryzują się wysoką jakością i rzetelnością naukową, poprzez zastosowanie nowoczesnych metod eksperymentalnych, wielu modeli badawczych, w tym modeli komórkowych ze stałą i przejściową ekspresją RNA FMR1; odpowiednich kontroli eksperymentów i weryfikacji wyników badań wielkoskalowych. Co ważne, uzyskane wyniki mogą również stanowić podstawę do formułowania nowych hipotez badawczych i dalszych badań w tej dziedzinie. Co warto podkreślić, mgr Katarzyna Tutak jest pierwszą autorką manuskryptu publikacji eksperymentalnej oraz pracy przeglądowej (jako jedna z 3 pierwszych autorów) opublikowanej w renomowanym czasopiśmie WIREs RNA, która jest ściśle związana z tematyką rozprawy doktorskiej. Bez wątpienia, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydatki w dyscyplinie nauki biologiczne oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Słabą stroną pracy jest forma przygotowania rozprawy doktorskiej.

Uwagi:

- Ponieważ niekanoniczna translacja ma ścisły związek ze stresem komórkowym ciekawym wątkiem badań byłoby uwzględnienie tego czynnika w badaniach Doktorantki (zwłaszcza w świetle wiedzy na temat roli RPS26 w odpowiedzi na stres, str. 31-32). Czy są takie plany i jaki rodzaj „stresu komórkowego” odpowiadałby warunkom patologicznym charakterystycznym dla zespołów związanych z łamliwym chromosomem X?
- Ciekawą obserwacją jest również podwyższony poziom ekspresji RPS26 w jajnikach, czy wiadomo coś o poziomie tego białka u pacjentek z FXPOI?
- Wszystkie wyniki są bardzo dobrze opracowane i opisane pod kątem analiz statystycznych, za wyjątkiem kilku wykresów na rysunku 5.3 (str. 42)
- do normalizacji wyników RT-qPCR w części 5 użyto genu *GAPDH*, pomimo że został on zidentyfikowany jako jeden z pięciu istotnie wzbogaconych na mRNA FMR1, czy mogło to wpłynąć na wynik eksperymentu?
- w niektórych przypadkach brakuje wyników potwierdzających wydajność wyciszenia, np. rysunek S1D (str. 47)
- literówka str. 27 - DORSHA

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że recenzowana praca doktorska Pani mgr Katarzyny Tutak pt. „*Identification of novel modifiers of noncanonical biosynthesis of toxic polyglycine protein from mutant FMR1 mRNA*” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego z zakresu nauk biologicznych. Praca spełnia wszystkie warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023 poz. 742 ze zm.), w związku z tym wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Tutak do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora. Ze względu na wysoki poziom naukowy przedstawionych badań, wnioskuję o wyróżnienie tej pracy doktorskiej.



Marta Olejniczak