

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Tutak

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

Ocena merytoryczna

Rozprawa doktorska koncentruje się na badaniu mechanizmów patogenezy warunków związanych z premutacją kruchego chromosomu X (FXPAC), które są wynikiem patogennych rozszerzeń 55-200 powtórzeń CGG w 5'UTR genu FMR1. Jednym z kluczowych mechanizmów patomechanicznych w FXPAC jest niekanoniczna synteza białek, znana jako translacja powtórzeń związanych z nie-ATG (RAN). Ten proces prowadzi do produkcji toksycznych białek RNA zawierających powtarzające się pojedyncze aminokwasy, takich jak białko zawierające poliglicynę, zwane FMRpolyG. FMRpolyG ma tendencję do agregacji i tworzenia wtrętów jądrowych w tkankach pacjentów, co jest uważane za jeden z czynników napędzających postęp choroby. Pomimo odkrycia translacji RAN ponad dekadę temu, mechanizmy i czynniki zaangażowane w regulację translacji RAN związanej z CGG są nadal nieznanne. Dlatego konieczne są dalsze badania dotyczące niekanonicznej syntezy białek w kontekście FXPAC.

W trakcie prowadzonych badań autorka dokonała istotnych odkryć, badając translację powtórzeń CGG w 5'UTR genu FMR1 przy użyciu mechanizmu niekanonicznej translacji RAN, co stanowi nowatorskie podejście z potencjałem do wyjaśnienia kluczowych aspektów patogenezy tych schorzeń. Identyfikacja białek wiążących się z mRNA FMR1 zawierającym rozszerzone powtórzenia CGG dostarcza nowego wglądu w interakcje molekularne zachodzące w tej patologii. Spośród tych białek, wyciszenie dziesięciu wybranych kandydatów przy użyciu siRNA pozwoliło na scharakteryzowanie czterech nowych modyfikatorów translacji RAN: RPS26, DHX15, DDX21 i ALYREF. Dodatkowo, RPS25, mimo że nie został pierwotnie zidentyfikowany w screeningu, również wykazał zdolność do modulowania translacji RAN.

Nowo odkryta rola RPS25 i RPS26 w regulacji translacji RAN sugeruje, że skład podjednostki 40S rybosomu ma istotny wpływ na syntezę białek FMRpolyG. To odkrycie otwiera nowe kierunki badań nad mechanizmami translacji niekanonicznej. Wykazano również, że białko chaperonowe TSR2, związane z RPS26, odgrywa rolę w regulacji translacji RAN, co może być związane z jego udziałem w włączaniu RPS26 do podjednostki 40S rybosomu. Globalna analiza proteomu w odpowiedzi na wyciszenie RPS26 ujawniła, że niedobór tego białka wpływa na stosunkowo małą frakcję proteomu, a mRNA tych białek charakteryzuje się GC-bogatymi 5'UTR, podobnymi do tych w FMR1.

Wyniki te mają istotne implikacje dla przyszłych badań i potencjalnych terapii. Obecne strategie terapeutyczne dla FXPAC głównie koncentrują się na łagodzeniu objawów, a brak specyficznych terapii stwarza potrzebę dalszych badań nad rolą zidentyfikowanych białek w regulacji translacji RAN.

Doktorat składa się z trzech głównych części. Pierwsza część obejmuje obszerny przegląd literatury, który dostarcza kontekstu teoretycznego i aktualnych osiągnięć w dziedzinie badań nad białkami wiążącymi RNA i chorobami związanymi z ekspansją powtórzeń. Druga część to publikowany manuskrypt, który prezentuje wyniki badań nad składem rybosomów i ich wpływem na translację niekanoniczną białek zawierających poliglicynę w warunkach związanych z FXRAC. Trzecia część zawiera wyniki niepublikowane, które szczegółowo opisują identyfikację i charakterystykę dodatkowych białek wpływających na translację RAN.

Wnioski z przeglądu literatury

Praca przeglądowa jest wysokiej jakości, porusza istotne zagadnienia i jest dobrze zilustrowana. Na podstawie przeglądu literatury stwierdzono, że toksyczne RNA zawierające rozszerzone powtórzenia (RNAexp) działa jako platforma wspierająca interakcje z wieloma białkami wiążącymi RNA (RBP), co prowadzi do ich sekwestracji i zakłócenia funkcji. Autorka szczegółowo omawia molekularne mechanizmy związane z RNAexp i ich interakcje z RBP, podkreślając wpływ RNAexp na transkrypcję, splicing, transport oraz translację nieinicjowaną przez AUG. W pracy analizowane jest również funkcjonalne zubożenie białek sekwestrowanych przez RNAexp oraz ich wpływ na patogenezę zaburzeń ekspansji powtórzeń (RED). Ponadto, autorka podkreśla konieczność dalszych badań nad mechanizmami translacji RAN i rolą poszczególnych RBP w rozwoju RED, co może mieć istotne implikacje terapeutyczne.

Jako, że doktorantka jest jednym z wiodących autorów tej pracy przeglądowej, chciałbym, by w czasie obrony odniosła się do moich dwóch pytań dotyczących konkluzji autorów:

1. Czy istnieją specyficzne cechy strukturalne RNAexp, które decydują o wyborze RBP, i jak te interakcje mogą różnić się w zależności od rodzaju choroby RED?
2. Jakie unikalne mechanizmy umożliwiają RBP reagowanie na warunki stresowe w obecności RNAexp, i jak te mechanizmy mogą być celowane w terapii RED?

Praca eksperymentalna

Manuskrypt "Ribosomal composition affects noncanonical translation and toxicity of polyglycine-containing proteins in fragile X-associated conditions" autorstwa doktorantki stanowi znaczący wkład w zrozumienie mechanizmów molekularnych związanych z FXTAS. Praca ta ukazuje kompleksowy i nowatorski sposób podejścia do badań nad niekanoniczną translacją RAN oraz wpływem specyficznych białek rybosomalnych na produkcję toksycznych białek FMRpolyG.

Praca skupia się na identyfikacji modyfikatorów translacji RAN, co jest kluczowe dla zrozumienia patogenezы FXTAS. Doktorantka wykorzystwała nowatorskie podejście polegające na znakowaniu RNA i analizie spektrometrycznej, co pozwoliło na zidentyfikowanie ponad 150 białek współdziałających z mRNA FMR1 zawierającym powtórzenia CGG. Metodologia zastosowana w pracy jest zaawansowana i odpowiednia do postawionych celów badawczych. Doktorantka wykorzystwała zarówno techniki

biochemiczne, jak i analizy bioinformatyczne, co pozwoliło na dokładne zbadanie wpływu RPS26 i TSR2 na translację RAN i toksyczność FMRpolyG.

Praca wykazała, że RPS26 i TSR2 są kluczowymi modyfikatorami translacji RAN. Wykazano, że pozbawienie komórek RPS26 prowadzi do zmniejszenia poziomu toksycznego białka FMRpolyG, co ma potencjalne implikacje terapeutyczne. Co więcej, odkryto, że 5'UTR mRNA wrażliwych na RPS26 jest bogaty w GC, co sugeruje specyficzność translacji zależnej od struktury mRNA. Odkrycia dotyczące specyficzności translacji wrażliwej na RPS26 mogą prowadzić do celowanych interwencji, które mogłyby zmniejszyć toksyczność związaną z białkami poliglicynowymi. Praca doktorantki jest dobrze przemyślana, metodycznie przeprowadzona i wnosi nową wiedzę do dziedziny badań nad FXTAS. Jest to osiągnięcie godne uznania, które świadczy o wysokim poziomie naukowym autorki.

Aby jeszcze bardziej pogłębić dyskusję na temat tej pracy i zrozumieć szczegóły mechanizmów przedstawionych przez doktorantkę, chciałbym zadać kilka pytań do rozważenia podczas obrony:

1. W badaniach wykazano, że RPS26 moduluje produkcję i toksyczność FMRpolyG poprzez wpływ na translację RAN zmutowanego mRNA FMR1. Jakie specyficzne cechy strukturalne lub sekwencyjne mRNA sprawiają, że są one wrażliwe na obecność lub brak RPS26?
2. Stwierdzono, że zubożenie RPS26 prowadzi do znaczących zmian w poziomach ekspresji około 20% ludzkich białek. Jakie konkretne grupy funkcjonalne białek są najbardziej dotknięte przez te zmiany? Czy istnieją specyficzne szlaki metaboliczne lub sygnalizacyjne, które są bardziej wrażliwe na poziomy RPS26, co mogłoby mieć konsekwencje dla zrozumienia mechanizmów patogenezy FXTAS?
3. W dyskusji wspomniano, że translacja RAN została również opisana w kontekście innych zaburzeń związanych z ekspansją powtórzeń, takich jak choroba Huntingtona czy stwardnienie zanikowe boczne związane z C9orf72. Jak wyniki badań nad RPS26 i RPS25 w FXTAS mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia translacji RAN w tych innych schorzeniach? Czy istnieją wspólne mechanizmy lub różnice, które mogą być kluczowe dla rozwoju terapii skierowanych na translację RAN w różnych chorobach neurodegeneracyjnych?

Dane nieopublikowane

Ostatnia część pracy doktorantki dotyczy jej nieopublikowanych wyników dotyczących charakterystyki czynników wpływających na niekanoniczną syntezę poliglicyny ze zmutowanego FMR1 mRNA. Doktorantka skrupulatnie analizuje wpływ różnych protokołów przygotowania próbek do spektrometrii masowej (MS) na wykrywalność i identyfikację białek związanych z mRNA FMR1. Badania obejmują porównanie metod wytrącania białek acetonem oraz oczyszczania za pomocą procedury SP3. W analizach wykryto istotne różnice w zestawach białek, co wskazuje na znaczenie techniki przygotowania próbek dla wyników analizy MS. W szczególności praca skupia się na roli białek DDX21, ALYREF oraz DHX15 w modulacji translacji RAN. Wyciszenie DDX21 i DHX15 obniżyło poziom FMRpolyG w dwóch modelach komórkowych, co sugeruje ich zaangażowanie w ten proces. Z kolei wyciszenie ALYREF

wpłynęło na poziom FMRpolyG w sposób zależny od zawartości powtórzeń CGG. Analizy bioinformatyczne danych MS RAW wykazały, że DDX21 i ALYREF mogą mieć kluczowe znaczenie w kontekście biologii FMR1. Dodatkowo, doktorantka przeprowadziła analizę funkcjonalną białek zidentyfikowanych w obu metodach przygotowania próbek MS, co ujawniło, że niektóre z białek mają specyficzne funkcje związane z metabolizmem RNA oraz translacją.

Praca doktorantki jest merytorycznie bogata i oparta na solidnych podstawach metodologicznych. Autorka wykazała się znakomitą umiejętnością adaptacji zaawansowanych technik analitycznych oraz dogłębną analizą uzyskanych wyników. Wyniki jej badań dostarczają nowych, cennych informacji na temat regulacji translacji RAN w kontekście zmutowanego FMR1 RNA.

Czy doktorantka mogłaby bardziej szczegółowo uzasadnić wybór konkretnych protokołów MS, pomimo braku statystycznej istotności wielu wyników? Czy autorka rozważyła zastosowanie alternatywnych metod przygotowania próbek, aby zwiększyć wiarygodność uzyskanych wyników? Jak doktorantka interpretuje fakt, że wyciszenie ALYREF miało wpływ na poziom FMRpolyG jedynie w modelu z krótszymi powtórzeniami CGG? Czy możliwe jest, że wyniki te mogą sugerować istnienie nieznanymi dotąd mechanizmów, które mogą kwestionować obecne teorie na temat translacji RAN?

Podsumowanie

Wysoko oceniam jakość merytoryczną rozprawy doktorskiej doktorantki mgr Katarzyny Tutak. Spełnia ona w pełni wymogi art. 187 ust. 1 i 2 Ustawy z dn. 20.07.2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 ze zm.) w zakresie szerokiej wiedzy ogólnej doktorantki, umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej oraz przedmiotu rozprawy, którym jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego przy zastosowaniu wyników własnych badań. W związku z tym wnioskuję o dopuszczenie mgr Katarzyny Tutak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, z uwagi na wyjątkowe osiągnięcia i nowatorski charakter jej pracy, wnoszę również o wyróżnienie tej rozprawy stosowną nagrodą.

dr hab. Wojciech Pokrzywa
Laboratorium Metabolizmu Białek
Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej
i Komórkowej w Warszawie
ul. Ks. Trojdena 4
02-109 Warszawa