



Prof. dr hab. Krzysztof Sobczak
Zakład Ekspresji Genów

Poznań, 18 września 2021

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Joanny Julii Chmielewskiej zatytułowanej „Regulacja ekspresji neurolignin w synapsie w warunkach fizjologicznych i w zespole łamliwego chromosomu X”

Niniejszą recenzję wykonałem jako osoba powołana do funkcji recenzenta przez Radę Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Oceny dokonałem według obowiązujących uregulowań prawnych na podstawie przekazanej mi rozprawy doktorskiej.

Praca doktorska mgr Joanny Chmielewskiej została wykonana w Laboratorium Molekularnych Podstaw Plastyczności Synaptycznej, Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego pod opieką merytoryczną dr hab. Magdaleny Dziembowskiej, pełniącej funkcję promotora w przewodzie doktorskim. W macierzystym zespole od wielu lat prowadzone są z dużym sukcesem badania nad poznaniem wpływu białek kluczowych dla funkcjonowania synaps w kontekście regulacji plastyczności centralnego układu nerwowego, a szczególnie w odniesieniu do patogenyzy relatywnie częstej choroby neurodegeneracyjnej jaką jest zespół łamliwego chromosomu X (FXS). Oceniana praca doktorska wpisuje się właśnie w ten nurt badań.

Szczególnymi obiektami badań doktorantki była klasa powierzchniowych białek adhezyjnych znajdujących się na synapsach i pełniących kluczową rolę w ich tworzeniu i stabilizacji. Są nimi lokalizujące postsynaptycznie neuroligniny. Pełnią one również ważną rolę w regulacji przewodnictwa synaptycznego, a ich mutacje są związane z występowaniem zaburzeń ze spektrum autyzmu. Głównym celem badań Doktorantki było określenie molekularnych mechanizmów stojących u podstaw regulacji poziomu neurolignin w synapsach zarówno w warunkach fizjologicznych jak i przy niedoborze białka FMRP, czyli w warunkach patologicznych związanych z FXS.

Oceniana rozprawa doktorska składa się z trzech głównych części. Pierwszą stanowi obszerny, liczący ponad 40 stron, wstęp precyzyjnie omawiający istniejący stan wiedzy w zakresie tematyki projektu. Doktorantka dokładnie opisuje budowę neurolignin, ich oddziaływanie z paralogami i innymi białkami, regulację ich stężenia w błonach komórek neuronalnych i glejowych, w tym na drodze proteolizy. Z drugiej strony skupia się również na funkcji białka FMRP, którego brak wynikający z obecności mutacji w genie *FMR1* jest przyczyną FXS, w regulacji ekspresji genów na różnych etapach, w tym zwłaszcza w transporcie mRNA i lokalnej translacji w dendrytach. Część ta napisana jest w sposób bardzo kompetentny i informatywny, a przygotowane przez Doktorantkę ryciny bardzo ułatwiają zrozumienie nieraz złożonych mechanizmów molekularnych. Może jedynie rozdział 1.9 „Transport mRNA i lokalna translacja w dendrytach” mógłby być nieco szerzej opisany ponieważ w pełni nawiązuje do zasadniczego celu pracy. Tu większość prac, do których znajdujemy odwołanie to prace starsze.

Drugą część pracy stanowi bardzo konkretnie nakreślony cel badań. Trzecim, najobszerniejszym elementem rozprawy jest drobiazgowy opis zasadniczej części pracy, rozpoczynający się przedstawieniem metodyki badawczej, a kończący opisaniem i przedyskutowaniem uzyskanych wyników prowadzonych badań. Jest to tradycyjny układ rozprawy. Na uwagę zasługuje bardzo klarowny opis poszczególnych podrozdziałów, w których znajduje się krótkie wprowadzenie ukazujące celowość podjęcia konkretnych zadań badawczych, a kończy konkluzja nie wykraczająca poza realny wynik przeprowadzonych eksperymentów.

Celem pierwszej części badawczej pracy było określenie różnic w poziomie ekspresji genów neurologin w warunkach prawidłowych i przy braku białka FMRP. Badania prowadzono z wykorzystaniem synaptoneurosomów uzyskanych z myszy typu dzikiego i z myszy z nokautem *Fmr1* (*Fmr1* KO) oraz pierwotnych hodowli komórek neuronalnych izolowanych z hipokampu badanych myszy. Przeprowadzone eksperymenty wykazały istotny udział FMRP w regulacji lokalnej translacji mRNA dla neurologin 1 i 3 przy braku wpływu na poziom samych mRNA. Eksperymenty zostały prawidłowo zaplanowane z uwzględnieniem szeregu dobrze dobranych kontroli, a wyniki właściwie zinterpretowane. Uzyskany wynik skłonił Doktorantkę do zadania kolejnego pytania, jakim była możliwość bezpośredniego oddziaływania FMRP z mRNA neurologin. Aby odpowiedzieć na to pytanie zastosowała te same modele biologiczne. Korzystając z metod przewidywania *in silico* wytypowała potencjalne miejsca w mRNA neurologin tworzące kwadrupleksy G, a następnie wykorzystując dobrze kontrolowany eksperyment immunostrącania kompleksów FMRP z RNA wykazała oddziaływanie mRNA dla wszystkich trzech neurologin z badanym białkiem. Wreszcie stosując zaawansowane metody mikroskopii fluorescencyjnej pokazała częściowe współwystępowanie analizowanych mRNA (wizualizowanych przez sondy FISH) z FMRP (wizualizowanym przez immunobarwienie).

Tu pojawia się pytanie o wskazanie konkretnych miejsc w mRNA neurologin bezpośrednio zaangażowanych w oddziaływanie z FMRP. Czy jest różnica w oddziaływaniu różnych izoform mRNA neurologin z FMRP? Wszystkie trzy mRNA genów *NLGN* mogą być wyposażone w różniące się znacznie długością sekwencje 3'UTR zarówno u człowieka jak i u myszy. Ogólnie wiadomo, że długość sekwencji 3'UTR podlega regulacji w wielu typach komórek, a szczególnie długie 3'UTR znajdują się w mRNA komórek nerwowych. Chciałbym prosić o przedyskutowanie tej kwestii na publicznej obronie, w kontekście najnowszych publikacji, w tym pracy, w której zastosowano analizy całotranskryptomowe typu CLIP-seq. Ponadto chciałby spytać, czy w przewidywaniu występowania kwadrupleksów G w mRNA *Nlgn* były uwzględnione izoformy mRNA z dłuższymi i krótszymi 3'UTR oraz czy przewidywane miejsca są zakonserwowane ewolucyjnie? Czy były podjęte próby eksperymentalnego potwierdzenia przewidywanych miejsc oddziaływania z FMRP? Jeśli nie, to jakie podejścia eksperymentalne można by zastosować w tym celu?

W dalszej części pracy Doktorantka zadała bardzo ambitne pytanie o wpływ aktywności neuronów na synaptyczną dystrybucję neurologin, monitorowaną ponownie dla warunków fizjologicznych i związanych z patologią FXS. Obserwowany we wcześniejszych eksperymentach wzrost poziomu neurologin przy braku FMRP mógł bowiem dotyczyć zarówno wnętrza synapsy jak i

błony postsynaptycznej. Aby odpowiedzieć na to pytanie mgr Chmielewska zastosowała zarówno chemiczne sieciowanie jak i biotynylację białek powierzchniowych, co dodatkowo pozwoliło na ustalenie białek tworzących dimery. Stosując obie, wzajemnie uzupełniające się metody zaobserwowała większą efektywność wbudowywania neuroligin 1 i 3 do błony postsynaptycznej przy braku FMRP. Ponadto wykazała, że proteoliza tych białek zależy od aktywności synaptycznej i następuje w krótkim czasie po pobudzeniu neuronalnym zarówno u myszy typu dzikiego jak i *Fmr1* KO, co sugeruje, że proces ten nie jest zaburzony w warunkach patologicznych FXS. Tą część uważam za najważniejsze odkrycie pracy, niosące największy ładunek nowości.

Trzecim celem badawczym postawionym w rozprawie doktorskiej było określenie mechanizmów kontroli poziomu neuroligin w synapsie. W wyniku przeprowadzonej analizy *in silico* potencjalnych miejsc cięcia proteolitycznego oraz wcześniejszych doniesień literaturowych w dalszych badaniach Doktorantka skupiła się na metaloproteinazie MMP-9 MMP-13. Wykonane eksperymenty z zastosowaniem odpowiednich inhibitorów oraz mutantów mysich pozbawionych ekspresji *Mmp-9* sugerują, że MMP-13 uczestniczy w obróbce proteolitycznej neuroligin. Wyniki tej części projektu są dobrą podstawą do podjęcia dalszych badań w kierunku wyjaśnienia mechanizmów stojących u podstaw regulacji puli neuroligin na drodze ich proteolizy.

Zawartość ocenianej pracy doktorskiej została już w większości opublikowana w 2019 roku w dobrym czasopiśmie z obszaru neurobiologii, jakim jest *Molecular Neurobiology* (IF₂₀₁₉ 4,5) (Chmielewska JJ et al. *Mol Neurobiol*, 56:2741-2759 (doi: 10.1007/s12035-018-1243-1). Mgr Chmielewska jest pierwszym autorem tej pracy. Z części dyskusja ocenianej rozprawy można zrozumieć, że wyniki przedstawione na rycinach 54 i 55 są rezultatem badań prowadzonych przez pozostałych współautorów pracy. Część dysertacji została więc już wnikliwie oceniona przez ekspertów z obszaru tematycznego projektu.

Czytając pracę zwróciłem jednak uwagę na kilka, raczej drobnych błędów opisowych i nieprawidłowości nomenklaturowych, które powtarzały się kilkakrotnie w ocenianej pracy. Z obowiązku recenzenta chciałbym zwrócić uwagę na kilka z nich:

1. Ekspresja jest wieloetapowym procesem wyrażania się genów, zatem jest ekspresja genów ale nie ma ekspresji białek, a tego właśnie zwrotu wielokrotnie używała Doktorantka w rozprawie. Może być biosynteza białek, można też badać poziom czy aktywność białek, ale nie ich ekspresję. Można również mówić o ekspresji genów mierzonej poziomem kodowanego mRNA lub białka.
2. Nazwy genów ludzkich zapisujemy wielkimi literami, a nazwy genów mysich z pierwszą wielką literą a pozostałymi małą, zawsze kursywą. W pracy pojawiły się np. *fmr1* (streszczenie, str. 57), co sugeruje raczej gen drożdżowy.
3. Powszechnie autorka stosuje określenia „N-końcem” i „C-końcem białek”. Prawidłowy zapis w j. polskim powinien brzmieć: koniec N białka lub koniec aminowy i odpowiednio koniec C lub koniec karboksylowy białka.

4. Zawarte na str. 118 sformułowanie „...okazało się, że poziom wewnątrzkomórkowej NLGN1 zmniejsza się w 2,5 minuty po pobudzeniu neuronalnym, a następnie zwiększa się ...” nie jest do końca poprawne. Nie wiadomo ani kiedy ani z jaką dynamiką obniża się ilość neuroleptiny 1. Badane były bowiem jedynie cztery punkty czasowe, a 2,5 minuty były pierwszym badanym punktem czasowym. Można się spodziewać, że do obniżenia dochodzi znacznie szybciej niż w 2,5 minuty, a może nawet obniżenie przybiera znacznie większą skalę w krótszym czasie od pobudzenia. Ponadto nie przedstawiono na wykresach (Ryc. 32) danych statystycznych potwierdzających wzrost w kolejnych punktach czasowych. To samo dotyczy kilku innych sformułowań dotyczących tego i podobnych eksperymentów (np. na str. 122 „...następował w ciągu 2,5 minuty po pobudzeniu...”).
5. W wielu miejscach pracy stosowane jest określenie izoformy neuroleptiny, przy czym jak rozumiem chodziło najczęściej o paralogi 1, 2 i 3 neuroleptiny. Izoformy to alternatywne warianty jakiejś cząsteczki, np. warianty mRNA czy białka pochodzącego z tego samego genu, a wynikające np. z alternatywnego splicingu lub obróbki potranslacyjnej. Zatem mogą istnieć izoformy mRNA i białka genu *NLGN1*. Z kolei paralogi to geny kodujące podobne białka, występujące w tym samym organizmie, powstające w procesie ewolucji na skutek duplikacji (w odróżnieniu od ortologów, czyli geny białek pokrewnych występujących u różnych organizmów). Przykładem może być sformułowanie „...dla każdej izoformy neuroleptiny...” na str. 130.
6. Trudno zrozumieć na czym polega alternatywny splicing izoform mRNA neuroleptiny przedstawionych na Ryc. 5. Czym są ssA i ssB? Podobna niejasność pojawia się na Ryc. 7.
7. Na Ryc. 9 zastosowano zbyt mały rozmiar czcionki.
8. Na Ryc. 4 nie jest wyjaśnione czym są elementy zaznaczone kolorem fioletowym i jasno niebieskim.
9. Czym jest kilobaza sekwencji transkryptu opisana na Ryc. 11? Czy chodziło o 1000 nukleotydów sekwencji RNA?

Z dogłębnej analizy wszystkich elementów rozprawy doktorskiej jasno wynika, że mgr Chmielewska w sposób dogłębny przestudiowała zagadnienia dotyczące budowy i funkcji neuroleptiny, regulacji ekspresji ich genów i wpływu ich mutacji na fenotypy neurologiczne. Chcąc jak najlepiej zrealizować założone cele badawcze, Doktorantka zaplanowała logiczny ciąg poszczególnych etapów badań. Pokazała, że potrafi w sposób kompetentny skorzystać z rozmaitych narzędzi badawczych, interpretując w sposób właściwy uzyskane wyniki. Dyskusja obserwacji eksperymentalnych przeprowadzona została w kompleksowy, a zarazem wyważony sposób. Praca doktorska jest solidna i odpowiada na kilka bardzo ważnych pytań biologicznych. Wskazane powyżej uchybienia i wątpliwości interpretacyjne nie wpływają w istotny sposób na moją bardzo wysoką ocenę niniejszej rozprawy.



Wnioski końcowe

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa mgr Joanny Chmielewskiej spełnia wszystkie warunki określone w art. 187 ust. 1 i 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z dnia 30 sierpnia 2018 r., poz. 1668, z późniejszymi zmianami). Zapoznając się z rozprawą odczuwałem ogromną satysfakcję zetknięcia się z rzetelnie i kompleksowo prowadzonymi badaniami, które doprowadziły do sformułowania kilku wniosków istotnych z poznawczego punktu widzenia. Świadczy o tym nie tylko opinia recenzenta, ale również opinia recenzentów i redaktora *Molecular Neurobiology*, w którym Doktorantka wspólnie z kolegami z zespołu opublikowała wyniki swoich badań. Mgr Chmielewska wykazała się wiedzą teoretyczną z zakresu prowadzonych przez siebie badań. Udowodniła, że potrafi rozwiązać problem naukowy poprzez odpowiednie zaplanowanie badań, wykonanie doświadczeń oraz interpretację ich wyników. Uzyskała istotne wyniki, poprawnie je opisała i wyciągnęła uprawnione wnioski. Dlatego też z całym przekonaniem zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Chmielewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego i popieram wniosek o nadanie jej stopnia naukowego doktora.

Uważam jednocześnie, że oceniana praca ma ponadprzeciętny charakter. Doktorantka publikując swoje wyniki w dobrym czasopiśmie naukowym dowiodła, że przeprowadzone przez nią badania mają duże znaczenie dla pogłębienia wiedzy w zakresie wielu aspektów potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów neurotognin, na poziomie translacji, ładowania białka do błon komórkowych oraz ich proteolizy, w tym głównie roli białka FMRP w lokalnej translacji tych mRNA na synapsach oraz związku z regulacją tych procesów z pobudzeniem synaptycznym. Zwracam się zatem o rozważenie wyróżnienia ocenianej pracy doktorskiej stosowną nagrodą.

Krzysztof Sobczak