



Instytut Matki i Dziecka

Zakład Genetyki Medycznej

p. o. Kierownika Zakładu – Prof. dr hab. Jerzy Bal

Institute of Mother and Child

L'Institut de la Mère et de l'Enfant

Warszawa, 17/11/2021r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Joanny Julii Chmielewskiej pt. Regulacja ekspresji neuroligin w synapsie w warunkach fizjologicznych i w zespole łamliwego chromosomu X.

Promotor: dr hab. Magdalena Dziembowska

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została przygotowana w Laboratorium Molekularnych Podstaw Plastyczności Synaptycznej Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego, w zespole, który od wielu lat zajmuje się badaniami dotyczącymi przekazywania nerwowego w warunkach fizjologicznych i, co warto podkreślić, w modelach ludzkich chorób dziedzicznych, w tym w zespole łamliwego chromosomu X. Aktualnie dysponujemy coraz lepszymi metodami diagnostycznymi opartymi o techniki wysokoprzepustowe (m.in. sekwencjonowanie następnej generacji), które umożliwiają identyfikację przyczyny wystąpienia choroby. Jednak to właśnie badania podstawowe mające na celu wyjaśnienie mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za rozwój określonej choroby, umożliwiają rozwój nowych terapii celowanych. Dokładne poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój układu nerwowego lub regulujących transdukcję sygnału w komórkach nerwowych, przekłada się na lepsze zrozumienie funkcjonowania układu nerwowego czy procesów uczenia się i pamięci, których zaburzenia obserwowane są w szeroko pojętych chorobach neurorozwojowych. Pozwala także na identyfikację „celów” dla potencjalnych strategii terapeutycznych.

Zaburzenia ze spektrum autyzmu (ASD) są jednymi z częściej występujących zaburzeń neurorozwojowych. Spektrum zaburzeń autystycznych jest szerokie, od postaci łagodnych takich jak zespół Aspergera, do ciężkich, w których zachowaniom autystycznym może towarzyszyć znaczna niepełnosprawność intelektualna (niewskazane jest używanie terminu „upośledzenie umysłowe”). U pacjentów mogą występować także inne zaburzenia np. deficyty mowy, padaczka, zaburzenia funkcjonowania układu pokarmowego czy cechy dysmorfii, takie jak wymienione w pracy wielkogłowie, niewymienione małowłowie (mimo tego, że cytowana jest praca podsumowująca wyniki badań pacjentów z ASD i mało-/wielkogłowie), oraz inne specyficzne cechy kliniczne. W przypadku gdy ASD towarzyszą dodatkowe cechy kliniczne mówimy o syndromicznych zaburzeniach ze spektrum autyzmu, które w zależności od obserwowanych zestawów cech, mogą zostać opisane jako zespoły chorobowe. Zgodnie z bazą Human Phenotype Ontology (<https://hpo.jax.org/app/>), zaburzenia ze spektrum autyzmu mogą wystąpić w przebiegu ponad 500 różnych jednostek chorobowych, w tym chorób monogenowych i zespołów chromosomowych.

Jednym z fenotypów, w przebiegu których obserwuje się zaburzenia ze spektrum autyzmu jest zespół łamliwego chromosomu X (FXS). Jest on opisywany jako najczęstsza monogenowa przyczyna ASD – szacuje się, że zespół może dotyczyć 1-6% pacjentów z ASD. Jednocześnie szacuje się, że około 46%

mężczyzn i 16% kobiet z zespołem łamliwego chromosomu X ma zdiagnozowane i/lub leczone zaburzenia ze spektrum autyzmu. W znaczącej większości przypadków przyczyną FXS jest ekspansja (nie amplifikacja!) trójki nukleotydowej CGG znajdującej się w regionie 5'UTR genu *FMR1* do zakresu powyżej 200 powtórzeń. Nagromadzenie sekwencji CG prowadzi do hypermetylacji genu *FMR1* i zahamowania jego ekspresji, czego konsekwencją jest brak białka FMRP – ważnego regulatora lokalnej syntezy białek w synapsie.

Mimo intensywnych badań mechanizmy molekularne leżące u podstaw rozwoju zespołu łamliwego chromosomu X, nie zostały ostatecznie wyjaśnione, zaś potencjalne terapie spersonalizowane oparte o wyniki wcześniejszych prac, nie dały oczekiwanych rezultatów. Stąd też konieczność dalszych badań, które w przyszłości mogą zostać wykorzystane do opracowania nowych podejść terapeutycznych. Przedstawiona do recenzji praca doktorska jest właśnie przykładem badań podstawowych, które mają pomóc w wyjaśnieniu podłoża zaburzeń rozwojowych / funkcjonalnych prowadzących do wystąpienia objawów klinicznych obserwowanych w przebiegu zespołu łamliwego chromosomu X.

Praca doktorska napisana jest w układzie klasycznym. Na 186 stronach Doktorantka zawarła obszerny wstęp, założenia i cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję oraz wnioski. Podstawowe części pracy uzupełnione są o streszczenie w języku polskim i angielskim, spis skrótów (w którym nastąpiło przesunięcie objaśnień względem skrótów) oraz spis tabel (11 pozycji) i rycin (55 pozycji). Części teoretyczne zostały przygotowane w oparciu o bogate piśmiennictwo liczące ponad 300 (!) pozycji literaturowych. Blisko 1/3 z nich to pozycje literaturowe opublikowane w ciągu ostatnich 5 lat.

Warto podkreślić, że wyniki przedstawione w pracy są efektem badań naukowych prowadzonych w ramach projektów badawczych finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki, w tym grantu Preludium, którego kierownikiem była doktorantka (2017/27/N/NZ1/01381). Częściowe wyniki zostały opublikowane w postaci artykułu naukowego pt. *Neuroigin 1, 2, and 3 Regulation at the Synapse: FMRP-Dependent Translation and Activity-Induced Proteolytic Cleavage* (autorstwo: Chmielewska JJ, Kuzniewska B, Milek J, Urbanska K, Dziembowska M) opublikowanego w *Molecular Neurobiology* w 2019 roku (IF=4,586) oraz były prezentowane na konferencjach naukowych krajowych i zagranicznych.

Pierwsza część pracy to obszerny 40-stronicowy **wstęp** omawiający podstawy funkcjonowania komórek nerwowych, biologię przekazywania impulsu nerwowego oraz procesy plastyczności istotne dla rozwoju układu nerwowego. Zawarta jest w nim także szczegółowa charakterystyka struktury i funkcji białek z rodziny neuroigin, których badania stanowią podstawę prezentowanej rozprawy doktorskiej. Interesujący jest fakt opisanego w genach kodujących białka neuroigin (*NLGN1*, *NLGN2*, *NLGN3*, *NLGN4X*) wariantów patogennych / potencjalnie patogennych stanowiących przyczynę rozwoju zaburzeń ze spektrum autyzmu. Szczegółowo zostały opisane wybrane warianty w genach *NLGN3* i *NLGN4X* pod kątem ich wpływu na ekspresję białka oraz przebieg choroby. Zastrzeżenie może budzić fakt nie sięgnięcia przez doktorantkę do bazy Human Gene Mutation Database, gdzie poza wariantami opisanymi w pracy, znajduje się informacja o kilkudziesięciu innych patogennych zmianach zidentyfikowanych w genach *NLGN* i odpowiedzialnych za zaburzenia ze spektrum autyzmu lub schizofrenię lub związanych z wyższym ryzykiem ich rozwoju. Druga uwaga dotyczy wymienienia sekwencjonowania eksomowego jako metody badawczej wykorzystanej do identyfikacji pierwszych mutacji w genach *NLGN3* i *NLGN4X*. Publikacje opisujące te mutacje zostały powstałe w latach 2003-2004, zaś pierwsze publikacje opisujące sekwencjonowanie następnej generacji jako metodę identyfikacji mutacji pojawiły się w roku 2012. W obu przypadkach wykorzystano sekwencjonowanie metodą Sangera tzw. genów kandydackich znajdujących się w *loci* powiązanych wcześniej z chorobą za pomocą analizy sprzężeń lub po zidentyfikowaniu w nich rozległej delecji.

Rozważania dotyczące związku wariantów w genach *NLGN* i ASD są punktem wyjścia do szerszego omówienia zaburzeń ze spektrum autyzmu, ze szczególnym uwzględnieniem zespołu łamliwego chromosomu X. W tym kontekście zostało także szczegółowo opisane białko FMRP (budowa i funkcja) oraz mysli model FXS, który wykorzystywano do badań w prezentowanej rozprawie doktorskiej.

Wstęp napisany jest przystępnym językiem, zawiera liczne ryciny i tabele, które ułatwiają zrozumienie tekstu. Moje główne zastrzeżenia dotyczą spraw edytorskich, a mianowicie zapisu nazw genów mysich i ludzkich. Zgodnie z Guidelines for Formatting Gene and Protein Names nazwy genów ludzkich powinny być pisane dużymi literami kursywą, białek ludzkich – dużymi literami prostym krojem czcionki, genów mysich – kursywą, z pierwszą literą dużą i pozostałymi małymi. Druga uwaga dotyczy zapisu mutacji, który powinien być zgodny z wytycznymi Human Genome Variation Society (<https://varnomen.hgvs.org/>). Według tych zasad odeszliśmy od nazewnictwa wariantów opartego o nazwę genu i nazwę mutacji na podstawie samej sekwencji białkowej podanej jako indeks górny. Prawidłowy zapis powinien uwzględniać numer sekwencji referencyjnej, zapis na poziomie DNA i ewentualnie zapis na poziomie białka. Czyli zapis mutacji powinien wyglądać następująco: *NLGN3*^{R451C} – NM_018977.4:c.1351C>T (p.Arg451Cys), *NLGN4X*^{D396X} - NM_020742.4:c.1185dup (p.Asp396Ter), *NLGN4X*^{R704C} - NM_020742.4:c.2110C>T (p.Arg704Cys).

W kolejnym rozdziale Pani mgr Joanna Chmielewska prezentuje główny **cel pracy** – zbadanie regulacji ekspresji neuroligin w synapsie w warunkach fizjologicznych i w zespole łamliwego chromosomu X. Osiągnięcie tego celu możliwe było poprzez realizację celów szczegółowych takich jak zbadanie wpływu obecności białka FMRP na proces translacji neuroligin, ich lokalizację komórkową i procesy cięcia proteolitycznego.

Kolejny rozdział „**Materiały i metody**” szczegółowo omawia procedury badawcze, w tym opracowane i udoskonalone w Laboratorium Molekularnych Podstaw Plastyczności Synaptycznej procesy izolacji synaptoneurosomów, zakładania pierwotnych hodowli neuronów hipokampalnych, stymulacji receptorów NMDA w warunkach *in vitro*, wytrącania RNA związanego z białkiem FMRP (wykorzystanie przeciwciał anti-FMRP), fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* jako metody identyfikacji określonych mRNA oraz metody analizy białek powierzchniowych. W rozdziale „Materiały i metody” pojawia się także opis metod stosowanych do profilowania poziomu RNA związanego z różnymi frakcjami poliribosomów i metody Click-iT, jednak nie znajdują one odniesienia w rozdziale pt. Wyniki. Opis wyników z zastosowaniem tych technik pojawia się dopiero w Dyskusji, zatem powstaje pytanie powinny być one omawiane w rozdziale 3.

Metody wykorzystane w pracy opisane są szczegółowo, w niektórych miejscach zamiast końcowych stężeń poszczególnych części składowych mieszanin reakcyjnych pojawiają się objętości dodawanych roztworów (np. podrozdział 3.3). Mamy też kilka powtórzeń tych samych informacji dotyczących pomiaru i oceny jakości izolowanego RNA, czy wykorzystania metody ilościowego PCR w czasie rzeczywistym. Wydaje mi się także, że w podrozdziale analiza statystyczna powinny jednak zostać wymienione stosowane testy, jak również określony poziom istotności statystycznej.

To co należy podkreślić to fakt, że stosowane techniki badawcze nie są technikami ogólnie dostępnymi, zaś stosowane procedury wymagają odpowiedniego doświadczenia, zwłaszcza te prowadzone z wykorzystaniem synaptoneurosomów i pierwotnych hodowli neuronów hipokampu. Jestem pod wrażeniem (pozytywnym) obrazów analiz wykonanych techniką Western blot. Została ona opanowana przez doktorantkę niemalże do perfekcji.

W rozdziale 4 przedstawione zostały **wyniki** prac prowadzonych przez mgr Joannę Chmielewską. Zostały one opisane w sposób uporządkowany i adekwatny do postawionych celów szczegółowych. Moje zastrzeżenia budzi fakt, że w rozdziale poza omówieniem wyników, dość szczegółowo są omówione procedury badawcze (np. opis pozyskania synaptoneurosomów – podrozdział 4.1, metoda Western blot – podrozdział 4.2.1, 4.2.2, metoda ilościowego PCR – podrozdział 4.3.2, stymulacja receptorów NMDA – podrozdział 4.4). Według mnie opisy te powinny być elementem rozdziału 3. Niektóre sformułowania odnoszące się do wyników innych grup badawczych raczej powinny stanowić element dyskusji. Dyskusyjne dla mnie jest również oddzielne omawianie dla każdej neuroliginy doświadczeń dotyczących ich lokalizacji w synapsie, jak rozumiem dla *NLGN2* nie zostało wykonane badanie wykorzystujące

sieciowanie białek powierzchniowych w komórkach wywodzących się z pierwotnych hodowli hipokampalnych. Być może wyniki te powinny zostać podsumowane w postaci wspólnej tabeli.

Niezależnie od tych uwag, w rozdziale 4 doktorantka konsekwentnie przedstawia uzyskane wyniki, które mają odpowiedzieć na pytanie, w jaki sposób regulowana jest aktywność białek z rodziny neuroligin w synapsie oraz jakie zaburzenia ich ekspresji/aktywności obserwowane są w przypadku braku białka FMRP. W analizach wykorzystuje zarówno badania laboratoryjne, jak również analizy *in silico* do predykcji miejsc wiązania białka FMRP czy miejsc cięcia dla enzymów proteolitycznych.

Doktorantka wykazała, że:

- 1) poziom białek NLGN1 i NLGN3 jest wyższy w synaptoneurosomach oraz pierwotnych hodowlach neuronalnych uzyskanych z komórek pobranych od myszy z delecją genu *Fmr1*; nie stwierdzono różnic w poziomie białka NLGN2. Zmiana poziomu białek nie zależy od poziomu ekspresji genów *Nlgn1* i *Nlgn3*. Wskazuje to na fakt, że **białko FMRP odgrywa rolę w regulacji lokalnej syntezy białek NLGN1 i NLGN3 w synapsie**.
- 2) **Białko FMRP oddziałuje z mRNA *Nlgn1*, *Nlgn2* i *Nlgn3***, na co wskazywały badania *in silico* - w sekwencjach transkryptów stwierdzono obecność sekwencji, do których może wiązać się domena RGG białka FMRP. W badaniach laboratoryjnych prowadzonych z wykorzystaniem synaptoneurosomów stwierdzono, że wraz z białkiem FMRP wytrącają się cząsteczki mRNA dla rodziny *Nlgn* (efektu nie obserwowano w przypadku preparatów uzyskanych od myszy z delecją genu *Fmr1*). W pierwotnych szczurzych hodowlach neuronalnych stwierdzono z kolei kolokalizację białka FMRP i mRNA dla poszczególnych neuroligin (jest to pierwsza wizualizacja tego zjawiska).
- 3) Brak białka FMRP powoduje zwiększenie poziomu powierzchniowej formy białek NLGN1 i NLGN3. **Stymulacja receptora NMDA powoduje proteolityczne cięcie neuroligin powierzchniowych**, zmniejszeniu ulega także wewnętrzny poziom tych białek. Proces ten nie jest zaburzony w przypadku braku białka FMRP.
- 4) **Proteazą zaangażowaną w proces cięcia proteolitycznego neuroligin (zwłaszcza NLGN3) jest enzym MMP-13**, co wykazano prowadząc badania na synaptoneurosomach myszy z delecją genu *Mmp9* (proces cięcia neuroligin miał taki sam przebieg jak w przypadku myszy ze szczepu dzikiego).

Na uznanie zasługuje zamieszczenie na końcu rozdziału 4 podsumowania wyników, w postaci krótkiego omówienia mechanizmów związanych w regulacją aktywności i lokalizacji neuroligin w warunkach fizjologicznych i w zespole łamliwego chromosomu X. Ostatni akapit tego podrozdziału wprowadza dyskusję nad potencjalnym wykorzystaniem uzyskanych wyników w opracowaniu strategii terapeutycznych dla FXS, zaburzeń ze spektrum autyzmu czy innych chorób związanych z dysfunkcją chorób.

Dyskusja wyników poprowadzona jest poprawnie i odwołuje się do dostępnego piśmiennictwa dotyczącego aktywności i procesów, którym podlegają neuroliginy. Uzyskane wyniki zostały dogłębnie przeanalizowane, włącznie z tym, że w rozdziale pojawił się opis dodatkowych doświadczeń wykonanych za pomocą metody frakcjonowania polirybosomów oraz metody Click-IT, potwierdzających rolę białka FMRP w regulacji lokalnej translacji neuroligin. Wykazano, że w przypadku myszy pozbawionych genu *Fmr1*, synteza neuroligin jest wyższa w warunkach braku stymulacji receptorów NMDA i nie zmienia się znacząco po podaniu czynnika indukującego. W końcowej części zawarte jest krótkie podsumowanie, zawierające sformułowanie dotyczące potencjalnej roli białka FMRP w regulacji białek kodowanych przez geny, w których zidentyfikowano mutacje odpowiedzialne za występowanie ASD. Autorka sugeruje, że uzyskane dane mogą wskazywać ścieżki do opracowania nowych strategii terapeutycznych w przyszłości. Trochę mi brakuje sugestii / hipotezy, jakie podejścia terapeutyczne mogłyby zostać zastosowane na podstawie uzyskanych wyników (inhibitory proteaz, selektywna blokada translacji NLGN?).

Kończącą część pracy stanowią wnioski, które odpowiadają celom szczegółowym zaprezentowanym w rozdziale 2 i uzyskanym wynikom.

Dla mnie, jako osoby zajmującej się w swojej codziennej pracy diagnostyką genetyczną i badaniem genetycznych przyczyn występowania zaburzeń rozwojowych, przedstawiona praca stanowi uzupełnienie naszych prac diagnostycznych i przyczynia się do wyjaśnienia molekularnych mechanizmów rozwoju chorób o podłożu genetycznym. Rozprawa stanowi istotny i oryginalny wkład w rozwój wiedzy dotyczący regulacji przekazywania sygnału w komórkach nerwowych, jak również roli białka FMRP w ich funkcjonowaniu, zwłaszcza w modulacji aktywności białek z rodziny neuroligin. Ma to szczególne znaczenie dla poznania mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój zespołu łamliwego chromosomu X czy zaburzeń ze spektrum autyzmu.

Całą pracę oceniam pozytywnie, mimo wymienionych wcześniej uwag, problemów ze składem tekstu (zostawione puste przestrzenie na stronach) i obecności błędów edytorskich wynikających z użycia słownictwa żargonowego lub bezpośredniego tłumaczenia z języka angielskiego, których nie będę dokładnie wymieniać.

Uważam, że rozprawa doktorska mgr Joanny Julii Chmielewskiej pt. „Regulacja ekspresji neuroligin w synapsie w warunkach fizjologicznych i w zespole łamliwego chromosomu X” spełnia wymagania art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, stan prawny na dzień 30 września 2011 r.) i w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 z późn. zm.). Wnoszę zatem do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Joanny Julii Chmielewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. Monika Goś, Prof. IMiD
Zakład Genetyki Medycznej
Instytut Matki i Dziecka
ul. Kasprzaka 17a, 01-211 Warszawa

