



Prof. dr hab. Piotr P. Stępień
UNIwersytet Warszawski
Instytut Genetyki i
Biotechnologii

ul. Pawińskiego 5A

02-106 Warszawa

tel. (22) 659-2240

fax. (22) 658-4176

email: stepien@ibb.waw.pl

23 października 2017

Recenzja rozprawy doktorskiej pani magister Marty Jurek pt. "Analiza struktury i funkcji torsyny 1A w kontekście patomechanizmu dystonii torsyjnej typu 1".

Paradoksem i problemem współczesnej biologii molekularnej jest fakt, że pomimo ustalenia ponad 16 lat temu sekwencji nukleotydowej ludzkiego genomu, funkcje fizjologiczne większości genów pozostają nieznane. Dodatkowe utrudnienie stanowi to, że produkty pojedynczego genu mogą lokalizować się w rozmaitych przedziałach komórkowych, pełnić różne funkcje w zależności od ich interakcji z różnymi ligandami, a wrreszcie mogą wpływać na wiele innych białek. Ta skomplikowana sieć wzajemnych zależności stanowi nadal podstawowe wyzwanie dla genetyków.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pani magister Marty Jurek wpisuje się w powyższą tematykę i dotyczy analizy funkcji ludzkiego białka torsyny A, kodowanego przez gen TOR1A, znajdujący się na chromosomie 9. Mutacje w tym genie są odpowiedzialne za występowanie dystonii torsyjnej typu 1 (DYT1), będącej jedną z najczęstszych form dystonii okresu rozwojowego. Choroba ta jest stosunkowo rzadka, jej częstość w populacji europejskiej wynosi ok. 1:200 000, i dziedziczy się w sposób autosomalny dominujący z niepełną penetracją : tylko u 30-40% nosicieli mutacji występują objawy kliniczne. Leczenie jest wyłącznie objawowe, skuteczność różnych metod jest dość ograniczona.

Pomimo ustalenia patogennego charakteru mutacji w eksonie 5 genu TOR1A, i wielu badań nad strukturą i funkcją białka torsyny, wiele aspektów molekularnego działania tego białka i powiązania ich z patologią dystonii pozostaje nieznanymi.

Z powyższych powodów podjęcie przez doktorantkę tego tematu było ze wszelkich miar uzasadnione, a jednocześnie stanowiło poważne wyzwanie w sytuacji istnienia obszernej literatury w tym zakresie, a także licznych kontrowersji i hipotez dotyczących funkcji TOR1A. Autorka postanowiła zbadać wzajemne relacje zmutowanych i niezmutowanych form torsyny 1A, a ponadto postanowiła przetestować hipotezę, że zmutowana forma białka TOR1A może wpływać na agregację wariantów huntingtyny.

Pani mgr Marta Jurek prowadziła swoje badania przy zastosowaniu nowoczesnych i wyrafinowanych metod biologii molekularnej. Skonstruowała liczne warianty ORF-u genu TOR1A, zmutowane i niezmutowane, wyposażone w różne znaczniki fluorescencyjne. Uzyskanie tych konstruktów pozwoliło na przeprowadzenie szeregu eksperymentów z wykorzystaniem obrazowania struktur subkomórkowych. Przedstawione w pracy wyniki sugerują, że zmutowane warianty białka TOR1A są zdolne do sekwestracji prawidłowej formy TOR1A, jednak są niezdolne do kompleksowania *in vivo* z innymi zmutowanymi wariantami TOR1A.

Badania nad interakcjami TOR1A z huntingtiną wykazały, że prawidłowa forma torsyny 1A nie powstrzymuje agregacji zmutowanej huntingtyny. Wynik ten sugeruje, że torsyna 1A nie pełni funkcji białka opiekuńczego w stosunku do huntingtyny. Z drugiej strony, doktorantka wykazała, że ekspresja patogennego wariantu torsyny 1A intensyfikuje agregację zmutowanej formy huntingtyny, co oznacza, że mutacja w TOR1A może skutkować w osłabieniu wewnątrzkomórkowych mechanizmów antyagregacyjnych lub zmieniać białko torsyny w element proagregacyjny. Wyniki te mogą mieć znaczenie dla projektowania terapii chorób wynikających z nieprawidłowej agregacji białek.

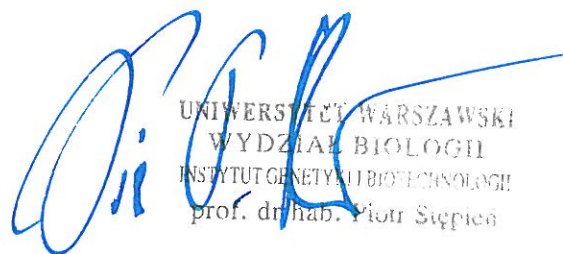
Badania nad zmutowanymi formami torsyny 1A przyniosły także charakterystykę subkomórkowej lokalizacji tego białka w sytuacji istnienia dwóch form: zmutowanej i niezmutowanej jednocześnie.

Ambitnym projektem była próba ustalenia za pomocą analizy w spektrometrze mas zmian proteomu frakcji białkowych reprezentujących różne kompartmenty komórkowe w komórkach ekspresujących zmutowaną formę torsyny.

Moja ogólna ocena przedstawionej rozprawy doktorskiej jest pozytywna. Moje uwagi krytyczne, przedstawione poniżej dotyczą głównie formy prezentacji wyników i niektórych koncepcji eksperymentów.

Wstęp nie zawiera uzasadnienia podjęcia przez doktorantkę badań nad agregacją huntingtyny, a przecież jest to jeden z ważniejszych wątków rozprawy, wymagający dokładniejszego wprowadzenia. Brak jest także szczegółów eksperymentów z badaniem białek metodą spektrometrii mas, w szczególności nie ma dokładnego wyjaśnienia na jakiej podstawie liczbowej zostały wybrane białka przedstawione w tabeli Nr 2. Wyjaśnienie takie jest tym bardziej konieczne, skoro autorka pisze, że uzyskane wyniki nie osiągnęły poziomu istotności statycznej ze względu na rozrzut pomiędzy eksperymentami. W moim odczuciu może to wynikać z tego, że metoda rozdziału komórek na frakcje opisana w na stronie 57 może budzić kontrowersje. Po pierwsze, mowa jest o czterech frakcjach, ale na ryc. 16 przedstawione są na żelach typu western blot tylko trzy. Po drugie, frakcja wirowana przy 1000xg stanowi tzw. debris czyli mieszaninę niezhomogenizowanych lub częściowo zhomogenizowanych komórek, i jako taka ma bardzo ograniczoną wartość do badań. W tej sytuacji sugerowałbym eksperymenty z uwidocznieniem cytoszkieletu lub rozdzielanie frakcji subkomórkowych w wirowaniu na gradientach.

Z drugiej strony jest oczywiste, że wkraczanie na pole badawcze bardzo mocno eksploatowane przez inne ośrodki naukowe stanowi bardzo ambitny projekt, którego nie wszystkie elementy muszą zakończyć się sukcesem. Dlatego też powyższe uwagi nie obniżają wartości prezentowanej rozprawy. Spełnia ona wszystkie wymogi ustawy o stopniach i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 i dlatego wnoszę do wysokiej Rady Naukowej Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie dopuszczenie pani magister Marty Jurek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



UNIWERSYTET WARSZAWSKI
WYDZIAŁ BIOLOGII
INSTYTUT GENETYKI I BIOTECHNOLOGII
prof. dr hab. Piotr Siepien