

Prof. dr hab. Janusz Siedlecki
Zakład Onkologii Molekularnej
i Translacyjnej
Centrum Onkologii-Instytut,
ul. Roentgena 5, 02-784 Warszawa

Recenzja rozprawy doktorskiej pt.

**„Analiza struktury i funkcji torsyny 1A w kontekście patomechanizmu
dystonii torsyjnej typu 1”**

Autorka: *mgr Marta Jurek*

Dystonia torsyjna typu 1 to rzadka, genetycznie uwarunkowana choroba układu pozapiramidowego, charakteryzująca się występowaniem mimowolnych ruchów powodujących skręcanie i wyginanie różnych części ciała, przez co chory przybiera często nienaturalną postawę. Choroba spowodowana jest pojedynczą mutacją w genie *TOR1A*. Gen ten, zlokalizowany na chromosomie 9q34, koduje białko o aktywności ATPazy należące do dużej rodziny białek AAA+ zwane torsyną 1A. Mutacja skutkuje delecją trzech kolejnych nukleotydów w eksonie 5 (c934-936delGAG) prowadzącą do utraty pojedynczego aminokwasu (kwasu glutaminowego) w pozycji $\Delta E302/303$. Utrata pojedynczego aminokwasu w pozycji 302/303 ma charakter patogenny. Uszkodzenie białka uniemożliwia prawidłowe funkcjonowanie neuronów. Torsyna 1A jest białkiem o MW 32 KD liczącym 332 aminokwasy tworzącym heksameryczny kompleks peptydowy. Prawdopodobnie w skład kompleksu poza torsyną 1A wchodzi dwa inne białka LAP1 i LULL1. Oba te białka zawierają argininy, które są nieobecne w torsynie 1A. Arginina jest prawdopodobnie konieczna dla ujawnienia się aktywności ATPazowej heksameru. Patogenna mutacja prowadzi do tworzenia нефunkcjonalnego heksameru, a to z kolei uniemożliwia kotwiczenie białka w siateczce endoplazmatycznej i gromadzenie się jej w okołojądrowej otoczce w postaci agregatów. Torsyna 1A jest białkiem istotnym dla utrzymania prawidłowej struktury

otoczki jądrowej. Patogeny wariant białka negatywnie wpływa na oddziaływanie z innymi elementami otoczki, czy bardziej ogólnie strukturami cytoszkieletu. To zaburzenie jest prawdopodobnie związane z patologią dystonii torsyjnej typu 1. Wyjaśnienie tego skomplikowanego mechanizmu jest niezwykle istotne, gdyż może się przyczynić do znalezienia leku, który mógłby jeśli nie zapobiec, to przynajmniej wpłynąć na złagodzenie objawów choroby. Badanie prowadzone przez doktorantkę stanowi próbę odpowiedzi na pytanie, w jaki sposób zmiany w strukturze torsyny 1A, będące wynikiem patogennej mutacji, wpływają na zmiany w funkcji tego białka a więc i na rozwój choroby.

Rozprawa ma układ typowy dla rozpraw na stopień doktora. Składa się ze Wstępu, Celu pracy, Materiałów i Metod, Wyników i Dyskusji. Całość pracy zamknięta jest podsumowaniem, w którym zawarte jest sześć wniosków. Spis literatury liczący 98 pozycji poprzedzony jest jeszcze streszczeniem pracy w języku polskim i angielskim.

Celem tej pracy była próba ustalenia zależności pomiędzy strukturą prawidłowej i uszkodzonej torsyny 1A, a jej lokalizacją komórkową i funkcją. Ponieważ dotychczasowe analizy nie pozwalają na definitywne ustalenie takiej zależności, podjęcie próby jej wyjaśnienia wydaje się być uzasadnione.

We Wstępie autorka przedstawia uzasadnienie dla podjęcia badań. Przedstawiona jest dotychczasowa wiedza na temat funkcji torsyny 1A i jej roli w kształtowaniu otoczki jądrowej i procesach transportu zarówno RNP jak i pęcherzyków synaptycznych, a także w uwalnianiu neuroprzekazników, w tym dopaminy. Doktorantka przedstawia też hipotezę sugerującą, że mechanizm dystonii torsyjnej związany jest z rzekomą funkcją torsyny 1A jako białka opiekuńczego. Uszkodzenie torsyny 1A byłoby odpowiedzialne albo za proces inicjacji degradacji nieprawidłowo sfałdowanych białek, albo za hamowanie lub spowolnienie agregacji różnych peptydów, w tym również TOR1A. W tym ostatnim przypadku nieprawidłowe białko torsyny 1A mogłoby prowadzić albo do bezpośredniej agregacji, albo wręcz tworzyć heksamery zawierające prawidłowe i nieprawidłowe formy torsyny 1A, które

dopiero w takiej konfiguracji ulegałyby agregacji. To właśnie powstanie/utworzenie agregatów przyczyniałoby się do inicjacji dystonii torsyjnej typu pierwszego. Wstęp napisany jest klarownym językiem.

Doktorantka wykorzystała w tej pracy wiele najnowocześniejszych metod biologii molekularnej służących przede wszystkim do badania białek. Większość ze stosowanych technik nie jest opisanych w szczegółach, co raczej zaliczyłbym do pozytywów tej pracy. Są to bowiem techniki powszechnie stosowane i w każdym zestawie odczynników są odpowiednie przepisy jak dany proces przeprowadzić. Warto też zauważyć, że niektóre procedury są obecnie przeprowadzane przez wyspecjalizowane jednostki i autor dostaje w większości przypadków nie tylko dane surowe, ale także i odpowiednio zanalizowane dane. Do takich procedur należą sekwencjonowanie nowej generacji czy spektrometria masowa. Obie te techniki, jak podkreśliła autorka, były wykonane w wyspecjalizowanej jednostce w IBB PAN.

Prawidłowe białko TOR1A lokalizuje się w świetle siateczki endoplazmatycznej skąd może przemieszczać się do otoczki jądrowej. Zmutowane białko wariant $\Delta 302/303$ tworzy agregaty w otoczce okołojądrowej. Do najważniejszych wyników tej pracy należy zaliczyć wykazanie, że w warunkach koekspresji prawidłowego białka TOR1A i wariantu zmutowanego $\Delta E302/303$ białko prawidłowe kolokalizuje się w tworzonych agregatach podobnych do tych tworzonych przez zmutowaną wersję $\Delta E302/303$. Koekspresja innego wariantu zwanego E171Q z prawidłową torsyną 1A kolokalizuje się w otoczce jądrowej podobnie jak sam wariant E171Q. Te wyniki jednoznacznie sugerują, że to warianty zmutowane decydują o lokalizacji, a więc i o możliwości spełnienia swojej biologicznej roli. Jak się wydaje odpowiada to sytuacji, w której białko prawidłowe jest inkorporowane przez struktury tworzone przez zmutowane białko (heksamery) pozbawiając komórki nerwowe lokalizacji, którą zajmuje białko prawidłowe. Warto w tym miejscu zauważyć, że z podobnym zjawiskiem włączania zmutowanych peptydów do struktur prawidłowych (czy też odwrotnie)

mamy do czynienia w przypadku tworzenia funkcjonalnych tetramerów białka TP53. Peptydy te oddziałując swoją domeną oligomeryzacyjną mogą inkorporować zmutowane białko tworząc nieaktywne transkrypcyjne heterotetramery. Być może odpowiada to sytuacji, w której prawidłowo sformowane struktury C-końcowe części torsyny 1A wchodząc w interakcje ze jedynie nieznacznie zmienionymi C-końcowymi częściami zmutowanego $\Delta 302/303$ białka (brak tylko jednego aminokwasu) tworzą nieaktywną, biologicznie zmienioną strukturę, która jest kierowana do granul magazynujących nieprawidłowo ustrukturalizowane białka.

Usunięcie z białka TOR1A sekwencji lokalizującej ΔSP prowadzi do braku właściwej lokalizacji. Usunięcie domeny MAD, która odpowiada za oddziaływanie z siateczką endoplazmatyczną nie zapobiega prawidłowej lokalizacji, ale przynajmniej dla części prowadzi do lokalizacji w nieprawidłowych kompartmentach siateczki. Te dane potwierdzają fakt, że kluczowym zjawiskiem związanym z chorobą jest prawidłowe uformowanie heksameru, gdyż to ono głównie odpowiada za właściwą lokalizację białka. To, czy prawidłowo sformowany heksamer działa bezpośrednio na ciało komórki neuronalnej, czy pośrednio za pomocą aktywacji innych procesów ważnych dla prawidłowo funkcjonujących neuronów pozostaje do wyjaśnienia. Niestety próba rozwiązania tego problemu, pomimo jak się wydaje, rozsądnego podejścia nie zakończyła się jednoznacznym sukcesem. Autorce udało się co prawda zlokalizować kilka peptydów, których ekspresja może być związana ze zmianami w poziomie ekspresji torsyny 1A, ale obserwowane różnice nie były znaczące statystycznie. Warto jednak podkreślić, że przynajmniej niektóre z tych peptydów były przez innych autorów wiązane z różnymi chorobami neurodegeneracyjnymi.

Warto też podkreślić, że przeprowadzone przez doktorantkę badania nie potwierdzają roli torsyny 1A w ochronie przed agregacją białek. Nie wydaje się zatem, aby rolą torsyny 1A była eliminacja uszkodzonych lub nieprawidłowo zwiniętych białek. Nie można jednak wykluczyć, że torsyna 1A może spełniać funkcję białka opiekuńczego w stosunku do ściśle

określonych substratów. W przeciwieństwie do prawidłowej torsyny zmutowany wariant $\Delta 302/303$ powoduje zwiększenie poziomu agregacji zmutowanej huntynktyny, co raczej sugeruje pośrednią, a nie bezpośrednią rolę torsyny 1A w agregacji nieprawidłowo zwiniętych białek.

Bardzo ładnie poprowadzona jest dyskusja. Doktorantka stara się bardzo ostrożnie i w wyważony sposób interpretować swoje wyniki. Zebrane dane zostały przedyskutowane w kontekście danych literaturowych. Ostrożność w wyciąganiu wniosków podkreśla dobrą znajomość tematyki pracy.

Podsumowując, uważam że autorka osiągnęła stawiane sobie cele. Przedstawione dane wzbogacają wiedzę o lokalizacji badanych białek, a badania kolokalizacyjne wskazują jednoznacznie, że o ostatecznej lokalizacji decyduje fakt obecności zmiany w białku prawidłowym. Ponadto, co wydaje się równie ważne, doktorantce udało się wykazać, że wprowadzenie do chorej komórki białka prawidłowego nie przywróci tej komórce zdolności do prawidłowego działania. Choć mechanizmu działania torsyny 1A nie udało się do końca wyjaśnić to wykazanie zmian w ekspresji pewnych genów może być wskazówką do dalszych badań. Uznając dokonania autorki pracy za w pełni oryginalne wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie o dopuszczenie autorki pracy – mgr Marty Jurek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

p.o. KIEROWNIKA
Zakładu Onkologii
Molekularnej i Translacyjnej
Prof. dr hab. n. med. Janusz A. Siedlecki