

Gdańsk, 30.04.2021

Ocena rozprawy doktorskiej

mgr Karoliny Zielińskiej

**pt. „Potencjał terapeutyczny oligonukleotydów bogatych w reszty guanozyny.
Charakterystyka strukturalna i funkcjonalna”**

Wstęp

Znajomość sekwencji chorobotwórczego genu stanowi podstawę dla projektowania leków skierowanych wobec chorób uwarunkowanych genetycznie. Jednym ze sposobów terapii może być zahamowanie ekspresji genów za pomocą małych cząsteczek kwasów nukleinowych, które można nazwać terapeutycznymi kwasami nukleinowymi. Zaproponowano kilka strategii terapeutycznych w tym zakresie, w tym strategię, która w oparciu o specyficzność antysensową wobec łańcuchów kwasów nukleinowych tworzy obiecujące podejścia terapeutyczne na bazie regulacji ekspresji genów. Do zaangażowanych w tą strategię należą m.in. oligonukleotydy antysensowe, ASO, krótkie, interferujące RNA (siRNA) oraz system CRISPR/Cas9. Z drugiej strony w procesach biologicznych typu rekombinacji, transkrypcji czy translacji wskazano na kluczową rolę kwadrupleksów czyli elementów struktury tworzących się z sekwencji bogatych w guanozyny, które w odpowiednich warunkach tworzą specyficzne G-tetrazy o oddziaływaniach warstwowych. Kwadrupleksy właśnie okazały się atrakcyjnymi celami dla zaprojektowania terapii przeciwnowotworowej. Jedną z metod opiera się na indukowaniu dwucząsteczkowych kwadrupleksów za pomocą krótkich oligorybonukleotydów bogatych w reszty guanozyny. Natomiast tworzenie heterohybrydy DNA:RNA typu dupleks-kwadrupleks polega na dołączeniu do antysensownego DNA sekwencji bogatej w reszty guanozyny zawierającej od jednego do trzech bloków guanozynowych. Indukcja takich struktur hybrydowych typu dupleks-kwadrupleks, DQH, pozwoliła zaobserwować między innymi obniżoną zdolność komórek nowotworowych do proliferacji.

Recenzowana praca zrealizowana została w Instytucie Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Zakładzie Biomolekularnego NMR pod kierunkiem Pani Profesor dr hab. Zofii Gdaniec. Badania Zespołu Pani Profesor skupiają się wokół problemów związanych z funkcją i dynamiką kwasów nukleinowych, szczególnie RNA. Dla realizacji postawionych celów stosowane są różne narzędzia spektroskopowe jak NMR, CD oraz UV wspierane przez inne metody biochemiczne i biofizyczne. Głównym przedmiotem prac Zespołu są kwadrupleksy RNA oraz układy hybrydowe typu dupleks-kwadrupleks badane w aspekcie możliwości ich powstawania, analizy strukturalnej i oddziaływań ligandów z oligonukleotydami RNA i DNA. Recenzowana praca doktorska mgr Karoliny Zielińskiej w pełni wpisuje się w zakres tych badań.

W świetle powyższych prac Zespołu celem rozprawy doktorskiej była według Autorki „...analiza spektralna oraz charakterystyka struktur hybrydowych typu dupleks-kwadrupleks i dupleksów z nieuporządkowanymi końcami za pomocą wybranych metod biofizycznych...”. Następnie zbadany został wpływ nienukleotydowych modyfikacji na właściwości tych struktur. Jako finalny element dodatkowy przetestowano opracowaną strategię wyciszania ekspresji genów na modelu komórkowym, gdzie obserwowano ekspresję białka zielonej fluorescencji. W mojej opinii tak postawiony cel „...analiza spektralna...” jest zbyt skromny wobec zrealizowanych badań. Dopiero zadania zaproponowane dla realizacji celu wskazują, że Doktorantka zmierzała do otrzymania takich dwufunkcyjnych oligorybonukleotydów, które będą selektywnie stabilizować i promować tworzenie struktury DQH czyli domeny kwadrupleksowej w strukturze hybrydy, aby w ostatnim etapie pracy zweryfikować taką strategię wyciszania ekspresji genu na modelu komórek nowotworowych HeLa.

Charakterystyka pracy

Przedstawiona do recenzji rozprawa zawiera 183 strony maszynopisu, w tym 11 stron odnośników literaturowych zawierających 185 pozycji. Tekst pracy podzielony jest na 10 rozdziałów, przy czym pierwszy i drugi to streszczenia w wersji polskiej i angielskiej, trzeci jest wprowadzeniem, a czwarty stanowi cel pracy. Część V, Literatura, obejmująca większość, około 160 odniesień do źródeł, zawiera przegląd zagadnień związanych z tematyką rozprawy i bardzo dobrze wprowadza czytelnika w atmosferę pracy doktorskiej. Na 50 stronach zawiera opis motywów strukturalnych kwadrupleksów i struktur hybrydowych typu dupleks-kwadrupleks oraz ich funkcje biologiczne. Szeroko opisane też zostały metody stosowane w badaniach kwadrupleksów zarówno fizykochemiczne jak i biochemiczne. Autorka bardzo solidnie przedstawiła fizykochemiczne podstawy stosowanych metod. Możliwości strategii terapeutycznych typu antygenowej, aptamerowej, rybozymowej, a przede wszystkim będącej przedmiotem pracy strategii antysensowej też są przedmiotem części literaturowej. Potencjalny cel terapii przeciwnowotworowej receptor EGFR został również opisany w aspekcie tworzenia nowych strategii terapeutycznych działających na poziomie mRNA i/lub DNA, a nie białka. W sumie część Literatura napisana jest jasno i wyczerpująco. Zakładam, że brak odnośników w podpisach pod niektórymi rysunkami w części Literatura wskazuje, że są one oryginalnymi prezentacjami Doktorantki.

Część VI pracy pt. „Wyniki” opisuje badania, które zostały przeprowadzone samodzielnie, natomiast w rozdziale VII Doktorantka przedstawiła wyniki badań otrzymanych wobec komórek nowotworowych. Wyniki te bardzo wzbogacają jej pracę, ale otrzymała je dzięki współpracy z Pracownią Analiz Struktur Subkomórkowych IChB PAN. Badania te przeprowadziła dr Agnieszka Fedoruk-Wyszomirska i jak rozumiem, wyraziła zgodę na przedstawienie ich w niniejszej pracy. Jestem pełna uznania dla takiej formy współpracy w ramach pracy doktorskiej i takiej formy jej przedstawienia. Nie ulega wątpliwości, że nie wykonała ich Doktorantka, ale są częścią pracy, bo tylko przedstawione razem z jej pierwszą częścią wnoszą do pracy odpowiednią wartość.

Dyskusja i podsumowanie zawarta jest na 10 stronach i zawiera opis wniosków wynikających z przeprowadzonych badań oraz elementy ich dyskusji. Natomiast rozdział Materiały i Metody zasługuje na uwagę gdyż napisany jest zwięźle, a jednocześnie bardzo przejrzysto. Nie ma problemu ze znalezieniem interesujących nas części.

Na końcu ogólnej charakterystyki pracy chciałam podkreślić jej wyjątkową formę graficzną. Nie tylko rysunki ilustrujące wyniki badań, ale również wszystkie schematy bardzo solidnie i z wyobraźnią przybliżają wiedzę o strukturach różnych form DNA i RNA. To jakby element rozpoznawczy tej pracy i godny naśladowania, dlatego zdziwił mnie trochę brak ilustracji w części Dyskusja.

Otrzymane wyniki

Jak wspomniałam powyżej, wyniki będące przedmiotem pracy zawarte są w rozdziale VI, jako wyniki własne oraz w rozdziale VII jako reprezentujące opracowany w ramach współpracy z dr Fedoruk-Wyszomirską modelowy system monitorowania zmian ekspresji fragmentu genu zintegrowanego z EGFP (białko fluoryzujące) po podaniu do komórek HeLa różnych antysensowych oligorybonukleotydów.

Badania rozpoczęto od zaprojektowania i otrzymania trzech modelowych oligorybonukleotydów: antysensowego CCC o długości 23 reszt oraz komplementarnych do niego oligorybonukleotydów docelowych G^T i U^T . Wszystkie one zawierają fragmenty bogate w reszty guanozyny, a połączenie cząsteczki antysensowej i fragmentu docelowego prowadzi do struktur drugorzędowych DQH i Dss. Badania strukturalne tych cząsteczek przeprowadzono za pomocą widm 1H NMR, a następnie analizowano ich właściwości stosując elektroforezę w żelu poliakrylamidowym oraz obserwując krzywe topnienia przy dwóch długościach fali. W ten sposób Doktorantka wykazała, że zaprojektowana cząsteczka CCC/ G^T przyjmuje strukturę hybrydy typu dupleks-kwadrupleks i różni się od CCC/ U^T brakiem tetrad czyli fragment bogaty w reszty guanozyny pozostaje nieuporządkowany. Analiza żelu poddanego barwieniu ligandem NMM selektywnym wobec równoległych kwadrupleksów ujawniła intensywny prążek tylko dla cząsteczki CCC/ G^T , czyli dała wynik zgodny z analizą NMR. Badania stabilności termicznej za pomocą widm UV wskazały, że temperatura topnienia (260 nm) dla CCC/ U^T była o 8 stopni niższa od wyznaczonej dla CCC/ G^T . Poza tym obecność długich końców w strukturze CCC/ U^T destabilizowała też domenę dupleksu DX i kwadrupleksu 2Q.

Dodatkowo porównano właściwości hybrydowych struktur dupleks-kwadrupleks w serii DNA:RNA i RNA-RNA. Tylko cząsteczka DNA-CCC/ G^T dała sygnały NMR typowe dla dupleksu i kwadrupleksu, natomiast sygnały DNA-CCC i DNA-CCC/ U^T pochodzą prawdopodobnie od ustrukturyzowanych pojedynczych nici. Poza tym wyniki wskazały, że generalnie zastąpienie oligorybonukleotydu CCC oligodeoksynukleotydem DNA-CCC prowadzi do bardzo niestabilnej struktury DNA-CCC/ U^T .

Kolejny etap badań polegał na wprowadzeniu do nici antysensowej nienukleotydowych modyfikacji chemicznych. Celem było uzyskanie bardziej stabilnych struktur hybrydowych typu dupleks-kwadrupleks wobec mniej stabilnych struktur nieuporządkowanych, a więc poprawienie selektywności względem sekwencji docelowych. Wprowadzono cztery typy modyfikacji struktur: (i) dodatkowa grupa 2'-OCH₃, (ii) reszty bez zasady heterocyklicznej (abasic) i alifatyczne łączniki, (iii) podstawniki typu grupa fosforanowa, reszta adenozyliny na końcu 5' oraz (iv) również na końcu 5' pochodna o-BMVC, ligand selektywny wobec kwadrupleksów. Powstały w ten sposób różne sekwencje nukleotydowe o potencjalnie różnej zdolności hybrydyzacji z docelowymi sekwencjami mRNA. Analiza rejonu iminowego widm NMR wskazała, że większość modyfikowanych oligonukleotydów występuje w roztworze w równowadze pomiędzy dwiema konformacjami: spinką i kwadrupleksem, a w przypadku cząsteczek paa i Aaa dominującą formą w roztworze jest

kwadrupleks. Ciekawe wyniki dało też porównanie temperatur topnienia, gdzie najstabilniejszy był oligonukleotyd CCC w postaci spinki.

Oddzielnym i głównym etapem badań było poznanie jaki wpływ mają w/w nienukleotydowe modyfikacje chemiczne na tworzenie i stabilność struktur hybrydowych typu dupleks-kwadrupleks oraz dupleks z nieuporządkowanymi końcami. Zaskakującym wynikiem było, że po hybrydyzacji z łańcuchem G^T , niezależnie od typu modyfikacji powstają generalnie struktury hybrydowe dupleks-kwadrupleks, natomiast inny obraz, szczególnie w zakresie G-tetrad powstaje dla cząsteczek o sekwencji U^T i dotyczy to głównie elementów zmodyfikowanych chemicznie. Zwraca uwagę również analiza temperatur topnienia, które mimo modyfikacji chemicznych niewiele różnią się pomiędzy strukturami hybrydowymi, ale świadczą o wyższej stabilności struktur DQH niż Dss. Z kolei wyniki analiz elektroforetycznych wskazały, że generalnie wszystkie oligonukleotydy migrowały podobnie jak CCC/G^T , ale (i) sekwencje paa/GT, pL3G/GT, pL4C/GT wskazywały na obecność dwóch konformerów, (ii) sekwencje pL2, pL3, pL4 migrowały wolniej, (iii) dla sekwencji Aaa/GT i AaC/GT nie zaobserwowano wyraźnych prążków. Nasunęła się sugestia, że niezależnie od typu modyfikacji w komórkach będą powstawały struktury DQH i Dss, a zależeć to będzie od różnicy jednego nukleotydu w sekwencji docelowej.

W dalszym etapie nadal celem było uzyskanie różnic w stabilności DQH i Dss. Wprowadzone zostały do badań antysensowe oligonukleotydy z G4-ligandami przyłączonymi kowalencyjnie do końca 5' oligorybonukleotydu CCC poprzez C6 aminołącznik. Ich zadaniem była efektywna inhibicja translacji. Badane ligandy: o-BMVC i o-BMVC-C3 wykazały do 20 razy wyższe powinowactwo do struktur z motywem kwadrupleksu niż do pozostałych. Poza tym wiązanie obu ligandów do hybrydy paa/ G^T było dwukrotnie silniejsze niż do innych struktur hybrydowych, co wskazuje na rolę obu elementów (p,a) tej struktury. Charakterystyczny wynik tworzenia struktur dwuniciowych kompleksów o-BMVC-C3— CCC/G^T i o-BMVC-C3— CCC/U^T otrzymano metodą elektroforetyczną, przy czym strukturę hybrydową zaobserwowano tylko dla o-BMVC-C3— CCC/G^T . Z kolei wzrost stabilności termicznej oznaczony dla o-BMVC-C3— CCC/G^T w stosunku do CCC/G^T też nie był zbyt wysoki. Jednak Autorka wskazuje, że obserwowane oddziaływanie liganda z domeną kwadrupleksu może mieć znaczenie w warunkach komórkowych zapobiegając rozplataniu kompleksu przez G4-helikazy.

Gdy proces translacji zależy od kwadrupleksu główną rolę odgrywa zawada steryczna ponieważ kwadrupleksy stanowią przeszkodę dla rybosomu poruszającego się wzdłuż mRNA. Efektem korzystnym byłaby dodatkowa stabilizacja struktury kwadrupleksów, gdyż uzyskalibyśmy pożądany efekt inhibicji wybranych procesów biologicznych. W dalszym etapie pracy przeprowadzone zostały badania zmierzające do potwierdzenia, że stabilizacja kwadrupleksów mRNA przyczynia się do represji jego translacji. W tym celu wykorzystano model genów reporterowych (białka GFP, zielonej fluorescencji). Wymagało to otrzymania oligonukleotydów antysensowych komplementarnych do sekwencji promotorowej odpowiedniego genu. Dzięki pomocy Prof. Piotra Kozłowskiego udało się znaleźć mutację punktową w genie EGFR spełniającą zadane wymogi. Doktorantka zaprojektowała cztery antysensowe oligonukleotydy (ASO) i wprowadziła je do wektora plazmidowego. Realizację dalszych badań czyli zweryfikowanie strategii wyciszania ekspresji genu zależnej od struktur kwadrupleksowych RNA na matrycy mRNA w ludzkich komórkach nowotworowych HeLa przeprowadzona została we współpracy z dr Agnieszką Fedoruk-Wyszomirską

z Pracowni IChB PAN kierowanej przez Prof. Elżę Wyszko. Powiedziałabym, że wyniki tych badań przedstawiono w perfekcyjnej formie w tabeli 5. Również podsumowanie badań zilustrowano w sensie dosłownym za pomocą tabel 91-93.

Komórki transfekowane dwufunkcyjnymi oligorybonukleotydami dały najniższą intensywność fluorescencji dla sekwencji los-G mRNA zawierających segment kwadrupleksu 1, 4 oraz 7 dając efekt wyciszenia ekspresji białka w 70-80%. Natomiast przy tworzeniu dupleksu z docelowym mRNA najsilniej ekspresję wyciszał oligonukleotyd 9 (64%). Przy różnicy tylko jednej reszty, dla los-U efekty były podobne, ale ilościowo trochę słabsze niż dla los-G. W przypadku komórek transferowanych fragmentem genu EGFR w dwóch wersjach, typ dziki i mutant, najsilniejsze wyciszenie ekspresji, 70-80%, zaobserwowano również dla fragmentu zdolnego do tworzenia kwadrupleksu. Wyniki potwierdziły więc dominującą rolę domeny kwadrupleksowej w procesie represji translacji. Natomiast badania wpływu oligonukleotydów antysensowych na aktywność zintegrowanych genów EGFR-G-EGFP wskazały wstępnie, że możliwe jest selektywne wiązanie się liganda NMM, co stabilizuje tworzący się kompleks G4-ligand-kwadrupleks. W sumie wyniki otrzymane w eksperymentach dr Fedoruk-Wyszomirskiej na komórkach nowotworowych potwierdziły, że zaproponowane przez Doktorantkę oligorybonukleotydy zawierające zarówno segment dupleksu jak i kwadrupleksu mogą być dużo lepszym modelem dla wyciszenia ekspresji genów, 69-86%, niż zwykłe oligonukleotydy antysensowe, 28-51%.

Przy ilościowym porównywaniu poziomu ekspresji odpowiednich genów zauważamy, że elementem, którego nie ma w pracy jest statystyczna analiza wyników. Jej brak szczególnie rzuca się w oczy gdy interpretacja wyników polega na porównaniu wysokości „słupków” jak na str. 146-150 czy porównywaniu małych różnic wyrażonych w procentach. Nie zawsze jesteśmy pewni czy wskazane różnice mieszczą się w granicach błędu czy są istotne.

Dyskusja wyników

Przedstawioną dyskusję wyników podzieliłabym na kilka części o różnym charakterze. W pierwszej z nich Autorka przedstawiła bardziej streszczenie otrzymanych wyników niż podsumowującą wyniki dyskusję. Dopiero od połowy tego rozdziału tekst jest bogatszy w elementy dyskusji. Na przykład na str 155 podane jest założenie, że nienukleotydowe modyfikacje wprowadzone do domeny Dss nie wpłyną na strukturę tej domeny, a wyniki wskazały, że dla trzech chemicznie modyfikowanych oligonukleotydów pojawia się struktura kwadrupleksu. Wobec tego dalej pojawia się dyskusja dlaczego taki efekt mógł wystąpić. Również ostatni akapit na stronie 156 jest przykładem dobrej dyskusji, gdzie przedstawione są wątpliwości, które uzasadniły podjęcie eksperymentu, który wykazał, że wstępne utrwalenie struktury poszczególnych nici nie zamknęło możliwości powstania struktury hybrydowej typu dupleks-kwadrupleks. W podobny sposób przeprowadzona jest dyskusja na str.157 o innym niż pozostałe struktury hybrydowe oddziaływanie cząsteczki paa/G^T z ligandami o-BMVC i o-BMVC-C3 czy o wpływie tych ligandów na stabilizację termiczną w warunkach komórkowych, gdzie oddziaływanie ligand kwadrupleks może obniżać aktywność helikaz i obniżyć możliwość rozplatania kwadrupleksu w komórce.

Elementem istotnym w tej części pracy jest ostatni punkt będący zwięzłym podsumowaniem osiągnięć Doktorantki. Jest to krótki tekst, ale pełen treści i stanowi bardzo dobry element zakończenia pracy.

Edycja pracy

Elementem wyróżniającym niniejszej pracy jest bardzo staranne i czytelne przedstawienie wyników pochodzących z eksperymentów NMR, danych spektroskopii UV zastosowanych do badania stabilności termicznej (staranne krzywe topnienia) oraz podziałów elektroforetycznych dających możliwość porównania migracji cząsteczek.

Na szczególne uznanie zasługuje szerokie zastosowanie w rysunkach miniaturowych schematów struktur przestrzennych różnych form cząsteczek DNA i RNA, co bardzo ułatwia interpretację poszczególnych eksperymentów.

Tekst pracy doktorskiej zawiera bardzo mało błędów edytorskich typu braku liter czy pomyłki w tekście, dlatego pominię ich wyliczanie. Usunęłabym jedynie z tekstu wyrazy/zwroty: *używając* (str 95), *wpierw* (str.107), *użytych buforów* (str.112). Drobnym mankamentem w niniejszym egzemplarzu pracy są podwójnie dołączone strony 151-154 oraz 143-150.

Wnioski końcowe

Podsumowując, recenzowana praca doktorska mgr Karoliny Zielińskiej prezentuje bardzo wysoki poziom przeprowadzonych badań. Wskazuje na kompetencje Doktorantki w zakresie metod detekcji i opisu oddziaływań oligonukleotydów z zastosowaniem różnych metod spektroskopowych.

Stwierdzam, że rozprawa Pani Karoliny Zielińskiej pt. „*Potencjał terapeutyczny oligonukleotydów bogatych w reszty guanozyny. Charakterystyka strukturalna i funkcjonalna*” spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim przez Ustawę o Stopniach i Tytule Naukowym i przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu wniosek o dopuszczenie Pani mgr Karoliny Zielińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



prof. dr hab. inż. Zofia Mazerska