



Poznań, 2021-04-22

RECENZJA

Pracy doktorskiej Pani mgr Karoliny Zielińskiej

pt.: „**Potencjał terapeutyczny oligonukleotydów bogatych w reszty guanozyny.**

**Charakterystyka strukturalna i funkcjonalna”**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr Karoliny Zielińskiej została wykonana w Zakładzie Biomolekularnego NMR, Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu, pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Zofii Gdaniec oraz dr Doroty Gudanis, pełniącej rolę promotora pomocniczego. Tytuł pracy sugeruje, iż mieści się ona w nurcie badań nad G-kwadrupleksami, czteroniciowymi strukturami formowanymi przez oligonukleotydy bogate w reszty guanozyny czyli nad tematyką, którą od dłuższego czasu zajmuje się Zespół Pani promotor.

Praca doktorska dotyczy poznania właściwości oligonukleotydów antysensowych zawierających dodatkowo segment bogaty w reszty guanozyny oraz sprawdzenia możliwości wykorzystania ich do selektywnego rozpoznania docelowych sekwencji RNA, w których wystąpiła mutacja punktowa. Cele szczegółowe pracy obejmowały: (1) zaprojektowanie i otrzymanie modelowych, dwufunkcyjnych oligonukleotydów antysensowych w serii RNA i DNA oraz sekwencji docelowych różniących się jedną resztą nukleotydową w regionie bogatym w reszty guanozyny; (2) zaprojektowanie i otrzymanie dwufunkcyjnych oligorybonukleotydów zawierających modyfikacje chemiczne; (3) charakterystykę hybrydowych struktur typu dupleks-kwadrupleks (DQH) oraz dupleksu z nieuporządkowanymi końcami (Dss) za pomocą wybranych metod biofizycznych tj.  $^1\text{H}$  NMR, spektroskopii UV-Vis, CD oraz elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (PAGE) w warunkach natywnych; (4) określenie wpływu liganda stabilizującego kwadrupleks (G4-liganda) na tworzenie się struktur DQH lub Dss; (5) przetestowanie *in cellulo* strategii





wyciszania ekspresji genów kodujących białko EGFR lub jego zmutowany odpowiednik EGFR-L858R, zależnej od powstania struktur kwadrupleksowych na matrycy mRNA, z wykorzystaniem linii komórek HeLa.

#### *Ocena pracy*

Z formalnego punktu oceniana praca doktorska ma formę klasycznej rozprawy z podziałem na 10 części: streszczenie w języku polskim i angielskim (abstract), wprowadzenie, cel pracy, część literaturową, wyniki, dyskusję, materiały i metody, oraz spis cytowanej literatury obejmujący 185 pozycji. Praca poprzedzona jest wykazem publikacji i wystąpień konferencyjnych Doktorantki oraz informacją o kierowaniu grantem badawczym służącym rozwojowi młodych naukowców IChB PAN (edycja 2018), zatytułowanym: Nowe układy hybrydowe RNA typu dupleks-kwadrupleks o potencjale do regulacji ekspresji genów. Ponadto, tuż za spisem treści umieszczono wykaz skrótów stosowanych w pracy (str. 16-17). Praca została napisana w języku polskim i obejmuje 183 strony, na których łącznie zamieszczono 94 rysunki oraz 5 tabel. Cała praca jest bogato ilustrowana i przygotowana bardzo starannie pod względem edytorskim. Dodatkowym ułatwieniem dla czytelnika śledzącego wyniki i ich dyskusję stanowi laminowana wkładka, zawierająca Tabelę 1 i Tabelę 2 (oryginalnie obie tabele znajdują się odpowiednio na stronie 100 i 112 rozdziału VI. Wyniki).

W liczącym pięć stron wprowadzeniu Autorka w sposób interesujący przedstawia problematykę badawczą rozprawy, jednocześnie uzasadniając stosowanie nazwy dwufunkcyjny oligonukleotyd w odniesieniu do przedmiotu badań czyli oligonukleotydów zdolnych do tworzenia struktur hybrydowych typu dupleks-kwadrupleks (DQH) z komplementarnym fragmentem docelowego mRNA. Do realizacji założeń pracy wybrano docelowy mRNA o sekwencji zawierającej motyw GGGCUGG, który w wyniku mutacji punktowej w genie kodującym EGFR u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca ulega zmianie na GGGCGGG. Część literaturowa zaczyna się od wprowadzenia czytelnika w tematykę G-kwadrupleksów DNA i RNA, w szczególności omówione są elementy wpływające na ich różnorodną topologię oraz niekanoniczne motywy strukturalne





kwadrupleksów RNA (np. U-tetrydy). W kolejnej części Doktorantka opisała szczegółowo czynniki wpływające na stabilność struktur kwadrupleksowych. Podrozdziały omawiające występowanie i znaczenie kwadrupleksów oraz struktur hybrydowych typu dupleks-kwadrupleks, oraz poświęcone strategiom terapeutycznym w szczególności w aspekcie terapeutycznych oligonukleotydów, uzasadniają naukowo podjęcie działań ukierunkowanych na wykorzystanie struktur hybrydowych typu dupleks-kwadrupleks (DQH) jako narzędzia do wyciszania ekspresji genów. Notabene, w podrozdziale V.8 omówiona jest nadekspresja genu *EGFR* (czyli receptora czynnika wzrostu naskórka), która występuje w większości komórek nowotworów złośliwych, w tym we wspomnianym już niedrobnokomórkowym raku płuc. Autorka dokonała także przeglądu metod biofizycznych i biochemicznych stosowanych w badaniach G-kwadrupleksów. Warto wspomnieć też o niewielkim podrozdziale odnoszącym się do obecnej sytuacji pandemicznej na świecie, zatytułowanym „Szczepionki mRNA przeciw COVID-19”. Autorka słusznie zauważa tutaj, że „sukces szczepionek mRNA otwiera perspektywy wykorzystania RNA do innych zastosowań terapeutycznych”.

Po obszernym rozdziale literaturowym, mgr Karolina Zielińska przystępuje do opisu przeprowadzonych eksperymentów i tym samym omówieniu wyników badań. W rozdziale VI zatytułowanym Wyniki, zawartych jest wiele rysunków (zawierających np. widma NMR, profile topnienia czy schematy badanych struktur), które pozwalają bez trudu śledzić tok rozumowania Doktorantki podczas analizy wyników. W miarę możliwości postaram się w sposób kompaktowy przybliżyć wyniki tych badań i ich interpretację przedstawioną przez Autorkę. Pierwszym etapem prac było zweryfikowanie możliwości tworzenia różnych struktur drugorzędowych (DQH lub Dss) w zależności od tego, czy nić docelowa, rozpoznawana przez zaprojektowany dwufunkcyjny oligonukleotyd o sekwencji 5'-C-GGG-C-GGG-C-CUUCAAGUCCGGCA-3' (CCC), zawierała motyw -GGGCGGG- (nić zwana  $G^T$ ) czy też motyw -GGGCUGG- (nić zwana  $U^T$ ). Na podstawie analizy widm  $^1H$  NMR badanych układów CCC/ $G^T$  i CCC/ $U^T$  oraz cząsteczek referencyjnych ( $U^T$ ,  $G^T$ , CCC, 2Q, DX) Autorka stwierdziła, że zaprojektowana cząsteczka CCC/ $G^T$  przyjmuje oczekiwaną strukturę hybrydową typu dupleks-kwadrupleks. Postulat ten został potwierdzony za pomocą





elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w warunkach natywnych. Analiza profili topnienia otrzymanych przy obu długościach fali (260 i 295 nm), w buforze potasowym dla modelowych układów CCC/G<sup>T</sup> i CCC/U<sup>T</sup> oraz kwadrupleksu 2Q i dupleksu DX doprowadziła Autorkę do wniosku, że trwałość termiczna CCC/G<sup>T</sup> jest w obu przypadkach (69,4 °C wyznaczone przy 260 nm i 68,8 °C wyznaczone przy 295 nm) większa niż DX (64,4 °C wyznaczone przy 260 nm) i 2Q (65,5 °C wyznaczone przy 295 nm), zaś układ CCC/U<sup>T</sup> jest mniej stabilny niż DX. Autorka wykonała też analogiczne eksperymenty dla nici antysensowej w serii DNA. Zgodnie z oczekiwaniami, stwierdziła, że temperatura topnienia dla struktury RNA:RNA była o około 8 °C wyższa niż dla odpowiedniej cząsteczki DNA:RNA. Opisane w tym rozdziale eksperymenty były prowadzone w obecności kationów potasu (60 mM) lub sodu (160 mM). Autorka zauważyła, że rodzaj jonu, jak i siła jonowa wpływają znacząco na różnice w stabilności termicznej układu CCC/U<sup>T</sup>. Czy zatem inne jony, w szczególności jony Mg<sup>2+</sup> występujące w środowisku wewnątrzkomórkowym mogłyby zaburzyć stabilność obu domen w hybrydzie DQH i w konsekwencji doprowadzić do utworzenia dupleksu Dss?

Kolejna część pracy jest poświęcona badaniom właściwości dwufunkcyjnych oligonukleotydów poddanych modyfikacjom chemicznym tj. (1) wprowadzenie modyfikacji 2'-OMe do segmentu dupleksu; (2) wprowadzenie reszt pozbawionych zasad heterocyklicznych (abasic) albo alifatycznych łączników różnej długości pomiędzy dwa bloki guanozynowe lub pomiędzy segmentem dupleksu a kwadrupleksu; (3) dołączenie grupy fosforanowej (p) lub reszty adenozy (A) na końcu 5' w miejsce reszty cytydyny modelowego oligonukleotydu CCC. Analiza widm <sup>1</sup>H NMR oraz profili migracji w żelu poliakrylamidowym tak zmodyfikowanych 9 pojedynczych nici wykazała ich tendencję do tworzenia struktur kwadrupleksowych, szczególnie widoczne to było w przypadku oligorybonukleotydów paa i Aaa z dwiema resztami pozbawionymi zasad heterocyklicznych (abasic). Autorka zaproponowała dodatkowy eksperyment <sup>1</sup>H NMR, który wykazał, że wstępne ustrukturyzowanie poszczególnych nici nie przeszkadza w powstaniu struktury hybrydowej DQH. Następnie porównała widma <sup>1</sup>H NMR i krzywe topnienia zarejestrowane





dla wszystkich struktur DQH i Dss utworzonych po połączeniu modyfikowanych oligonukleotydów antysensowych z nicią o sekwencji  $G^T$  lub  $U^T$ , zarówno w buforze potasowym, jak i sodowym. Analizując przebieg profili krzywych topnienia zarejestrowanych przy 295 nm Autorka potwierdziła swoje wcześniejsze wnioski, wynikające z widm NMR, że cząsteczki  $paa/U^T$ ,  $Aaa/U^T$  i  $AaC/U^T$  mają tendencję do zawiązywania domeny kwadrupleksowej. Z kolei wnikliwa analiza profili migracji badanych układów w żelu poliakrylamidowym pozwoliła uzyskać dodatkowe informacje o wpływie wybranych modyfikacji na ich właściwości, m.in. można było ocenić skłonność kwadrupleksów do dimeryzacji. Autorka wyznaczyła temperatury topnienia niemodyfikowanych oraz zawierających modyfikacje chemiczne struktur hybrydowych DQH oraz dupleksów Dss, w obu buforach. Następnie, dla omawianych struktur (pytanie: wszystkich?) podjęła również próbę wyznaczenia parametrów termodynamicznych, ale proces denaturacji układów hybrydowych okazał się niezgodny z modelem dwustanowym. Uważam, że przyczyny tego zjawiska Autorka słusznie dopatruje się w różnej stabilności poszczególnych domen. Co istotne, do poparcia tej tezy Autorka posłużyła się analizą temperaturowej zależności widma  $^1H$  NMR oraz dwuwymiarowych widm NMR (tj. 2D  $^1H$ - $^{15}N$  HSQC, 2D  $^1H$ - $^1H$  NOESY) zarejestrowanych dla cząsteczki  $paa/G^T$ . Autorka skorzystała też z analizy widm CD, głównie, aby potwierdzić tworzenie równoległej domeny kwadrupleksu niezależnie od typu i miejsca wprowadzonej modyfikacji chemicznej.

Ponadto, celem zwiększenia stabilności i selektywności dwufunkcyjnych oligonukleotydów antysensowych, Doktorantka zaprojektowała układ składający się z modelowego oligonukleotydu CCC z przyłączoną kowalencyjnie poprzez C6-aminolącchnik przy końcu 5' pochodną o-BMVC-C3. W pierwszej kolejności, Autorka wyznaczyła wartości stałych wiązania,  $K_a$  ligandów o-BMVC i o-BMVC-C3 z czterema wybranymi hybrydami DQH oraz dupleksami CCC/ $U^T$  i DX. W tej części pracy brakuje mi: (1) wartości stałych wiązania tych ligandów do kwadrupleksu 2Q; (2) chociaż jednego rysunku z widmami emisji, stanowiącymi podstawę do wykreślenia krzywej zależności zmian fluorescencji od stężenia dodawanego oligonukleotydu do roztworu liganda o-BMVC lub o-BMVC-C3. Następnie





udowodniono, że ligand o-BMVC-C3 wiąże się do domeny kwadrupleksu i wywołuje niewielki (dokładnie mówiąc o 2,7 °C) wzrost stabilności termicznej hybrydy o-BMVC-C3-CCC/G<sup>T</sup>. Zatem wykazano, że w tak zaprojektowanych oligonukleotydach dwufunkcyjnych (tzn. posiadających trwale związany ligand selektywny wobec kwadrupleksu) tkwi potencjał diagnostyczny i terapeutyczny.

Najistotniejszy według mnie cel pracy czyli badania dotyczące sprawdzenia potencjału terapeutycznego zaprojektowanych oligorybonukleotydów został wykonany we współpracy z dr Agnieszką Fedoruk-Wyszomirską, z Pracowni Analizy Struktur Subkomórkowych IChB PAN. Wyniki eksperymentów wyciszenia ekspresji genów w środowisku komórek ludzkich (linia Hela) zostały opisane w wyodrębnionym rozdziale VII. Tutaj nasuwa się pytanie, czy konieczne było zamieszczenie tych wyników poza rozdziałem zatytułowanym Wyniki?

Jednoznacznie wykazano, że oligorybonukleotydy zawierające segment dupleksu i kwadrupleksu efektywniej (na poziomie 69-86%) wyciszają ekspresję wybranych genów niż klasyczne oligorybonukleotydy antysensowe, tworzące dupleksy z docelowym RNA (tu obserwowano 28-51% poziom wyciszenia). W celu dalszej oceny potencjalnych zastosowań dwufunkcyjnych oligorybonukleotydów antysensowych porównano względny poziom wyciszenia genów różniących się tylko jedną resztą nukleotydową (Ios-G vs Ios-U oraz EGFR-G vs EGFR-U) za pomocą tych samych oligorybonukleotydów antysensowych. Eksperymenty te potwierdziły rolę domeny kwadrupleksowej w hamowaniu translacji. Natomiast badania wykonane z użyciem dwufunkcyjnych oligonukleotydów antysensowych i G-4 liganda (tu: NMM) wskazują, że obecność liganda NMM przyczynia się do obniżenia poziomu ekspresji genu kodującego białko fuzyjne EGFR-G-GFP. Szkoda, że niemożliwe okazało się porównanie wyciszenia poziomu ekspresji tego genu w obecności liganda o-BMVC-C3 - wolnego, jak i kowalencyjnie przyłączonego do oligonukleotydu antysensowego.

W rozdziale VIII Autorka jeszcze raz w sposób jasny i merytoryczny omawia uzyskane wyniki i dyskutuje je w świetle wyników uzyskanych przez innych badaczy. Bardzo ciekawym elementem dyskusji są propozycje Autorki dotyczące dodatkowych eksperymentów, na przykład takich, które pozwoliły na wyeliminowanie tworzenia się



niewielkiej populacji struktury z kwadruplexem dla cząsteczek paa/U<sup>T</sup>, Aaa/U<sup>T</sup> lub takich, które mogłyby potwierdzić powstawanie różnych form dla trzech cząsteczek: paa/G<sup>T</sup>, pL3G/G<sup>T</sup> i pL4C/G<sup>T</sup>. Merytoryczna część recenzowanej pracy doktorskiej kończy się nie tylko wyraźnym wypunktowaniem najważniejszych osiągnięć, ale także zawiera plany naukowe Doktorantki, w tym chęć udowodnienia, że kowalencyjne przyłączenie G-4 liganda do dwufunkcyjnego oligonukleotydu antysensowego pozwoli na skuteczniejsze wyciszenie ekspresji wybranego genu. W kontekście tych planów, chciałabym zapytać czy wykonywane już były jakiegokolwiek testy MTT z użyciem oligonukleotydu o-BMVC-C3-CCC (czy też innych modyfikowanych oligonukleotydów dwufunkcyjnych zaprojektowanych przez Doktorantkę) albo czy znana jest wartość IC<sub>50</sub> dla liganda o-BMVC-C3?

W przedostatniej części rozprawy, zatytułowanej „Materiały i Metody” zostały zamieszczone informacje dotyczące stosowanych odczynników, aparatury pomiarowej oraz programów stosowanych do analizy i prezentacji danych eksperymentalnych. Ponadto opisane zostały metody służące do syntezy, oczyszczania i oznaczania ilości otrzymanych kwasów nukleinowych (w tym sposób kowalencyjnego przyłączania pochodnej o-BMVC-C3 do oligonukleotydu CCC) oraz opisano poszczególne procedury pomiarowe.

W tym miejscu chciałabym podkreślić, że wysoko oceniam ładunek merytoryczny niniejszej pracy, walory estetyczne tekstu, jak i szatę graficzną. Jednak, w tak obszernej rozprawie nie sposób uniknąć uchybień redakcyjnych i błędów edytorskich, czy też niefortunnnych sformułowań, które z obowiązku recenzentki wymieniam poniżej:

Strona 15: Rozdział VIII ma inny tytuł w spisie treści niż na stronie 151.

Strona 79: „ /.../ mutacja w eskonie 21 polega na zmianie aminokwasu w pozycji 858 łańcucha białkowego z leucyny (L) na argininę (A).” Pomijając literówkę w słowie ekson, Autorka niefortunnie użyła sformułowania „mutacja polega na zmianie aminokwasu”, zamiast „mutacja prowadzi do zmiany aminokwasu”.

Strona 80: jest „otworzyły” zamiast „otworzyły” - druga literówka.

Strona 100: w tytule Tabeli 1 Autorka błędnie określiła struktury DQH i Dss jako dwuniciowe, zamiast struktury dwucząsteczkowe.





Strona 105, 106: wyrażenie „po zlanii /.../ nici” nie brzmi zbyt profesjonalnie.

Strona 143: powinno być „Na rysunku 89 przedstawiony jest /.../ antysensowego.”

Strona 169: Rysunek 94 przedstawia *de facto* tabelę.

Strona 171: Czy rzeczywiście widma emisji fluorescencji rejestrowano w przedziale długości fal od 450 do 650 nm jeżeli długość fali wzbudzenia wynosiła 470 nm?

W tekście występują tzw. sieroty czyli pojedyncze litery znajdujące się w ostatnim miejscu w wersie oraz brak jest spacji między tekstem a numerem cytowanej pozycji literaturowej, ujętej przez Autorkę w nawias okrągły. Ponadto, jako separator dziesiętny użyto kropki, tymczasem w języku polskim w tym celu stosuje się przecinek. Czy nazwy genów prawidłowo piszemy kursywą, zaś białek dużą literą i prosto, czy na odwrót?

W tym miejscu należy też stwierdzić, że znalezionych błędów jest niewiele i że w żaden sposób nie wpływają na moją pozytywną ocenę rozprawy. Przedstawiono w niej wartościowe wyniki, które będą niewątpliwie pomocne w dalszym projektowaniu dwufunkcyjnych oligonukleotydów antysensowych, spełniających wysokie oczekiwania stawiane związkom o znaczeniu terapeutycznym.

#### *Wniosek końcowy*

W mojej opinii praca doktorska Pani Karoliny Zielińskiej pt.: „Potencjał terapeutyczny oligonukleotydów bogatych w reszty guanozyny. Charakterystyka strukturalna i funkcjonalna” spełnia warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. (z późniejszymi zmianami) o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Wobec tego wnioskuję o dopuszczenie mgr Karoliny Zielińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę wartościowy naukowo i wysoki poziom merytoryczny badań, a także ich wszechstronność, zgłaszam wniosek do Rady Naukowej IChB PAN w Poznaniu o wyróżnienie tej pracy.

Z poważaniem,

dr hab. Anna Dembska, prof. UAM