



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

Wydział Nauk Biologicznych
i Weterynaryjnych

Toruń, dnia 20.02.2023 r.

dr hab. Dariusz Jan Smoliński, prof. UMK
Katedra Biologii Komórkowej i Molekularnej
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani magister Natalii Bartyś pt. „Optymalizacja potencjału oligonukleotydów antysensowych w regulacji alternatywnego splicingu w nowotworowych liniach komórkowych”

Rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem dr hab. Anny Pasternak, prof. ICHB i promotora pomocniczego dr inż. Jolante Lisowiec-Wąchnickiej, w Zakładzie Bioinżynierii Kwasów Nukleinowych Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Niniejszą ocenę wykonałem jako osoba powołana do funkcji recenzenta na podstawie decyzji Rady Naukowej Instytutu ICHB PAN.

Terapie genowe choć bardzo często trudne do przeprowadzenia, są moim zdaniem przyszłością medycyny w przypadku leczenia wielu chorób nowotworowych. W przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej podjęto bardzo udaną próbę zastosowania narzędzi molekularnych dla przywrócenia optymalnego balansu pomiędzy dwiema formami splicingowymi genu kinazy pirogronianowej (PKM). Kinaza ta katalizuje defosforylację fosfoenolopirogronianu do pirogronianu z jednoczesnym wytworzeniem cząsteczki ATP. Enzym ten zbudowany jest z czterech domen: większych A, B i C oraz małej domeny N-końcowej. W genie tym kodowanych jest 12 eksonów oraz 11 intronów. Alternatywny splicing prowadzi do powstania dwóch transkryptów genu, z dwoma wzajemnie wykluczającymi się eksonami. Produktami tego genu są dwie izoformy PKM1, PKM2. Transkrypt PKM1 występuje z eksonem 9 (bez eksonu 10), a transkrypt PKM2 z eksonem 10 (bez eksonu 9). Oba eksony mają taką samą długość, jednak różnią się od siebie sekwencją,

która koduje aminokwasy wchodzące w skład domeny C. Domena ta odpowiedzialna jest za tworzenie dimerów i tetramerów białka PKM. Izoforma PKM1 występuje w postaci tetrameru, przeważa w komórkach, które wymagają dostarczania dużej ilości energii takich jak komórki mięśniowe. Charakteryzuje się ona silnym powinowactwem do fosfoenolpirogonianu. Izoforma PKM2 z kolei może występować zarówno w formie tetrameru, jak i dimeru. W przeciwieństwie do formy tetrameru, która ma silne powinowactwo do fosfoenolpirogonianu, forma dimeru charakteryzuje się słabą aktywnością kinazową, co wynika z niskiego powinowactwa do PEP. PKM2 przeważa w komórkach szybko dzielących się. Występowanie tego wariantu białka jest naturalne dla komórek embrionalnych i macierzystych. W związku ze zdolnością komórek nowotworowych do szybkiej proliferacji, PKM2 jest główną kinazą pirogonianową produkowaną przez te komórki. Nadekspresja izoformy PKM2 została zidentyfikowana między innymi w nowotworach trzustki, piersi, prostaty czy jajnika.

Białko PKM2 ze względu na fakt, że przeważnie występuje w formie mniej aktywnego dimeru, pełni kluczową rolę w zwiększeniu możliwości produkowania związków budulcowych dla proliferującej komórki. Katalizuje ono przemianę fosfoenolpirogonianu w pirogonian ale z niską aktywnością charakterystyczną dla formy dimeru. Z tego powodu dochodzi do nagromadzenia się produktów pośrednich glikolizy, które zamiast być przekształcane w kolejnych etapach glikolizy i cyklu Krebsa, trafiają do szlaków biosyntetycznych, które dostarczają niezbędnych składników dla szybko proliferujących komórek. Działanie izoformy PKM2 nie ogranicza się tylko do defosforylacji fosfoenolpirogonianu, gdyż PKM2 może ulegać również translokacji do jądra, gdzie pełni funkcję kinazy białkowej oraz kofaktora transkrypcji. PKM2 jako transkrypcyjny kofaktor oddziałuje z czynnikiem transkrypcyjnym HIF-1, który w wyniku tej interakcji włącza ekspresję genów transportera glukozy 1 (*SLC2A1*), dehydrogenazy mleczanowej (*LDHA*) oraz kinazy dehydrogenazy pirogonianowej 1 (*PDK1*). Wszystkie te białka są niezbędne dla przekształcenia metabolizmu komórkowego z fosforylacji oksydacyjnej w glikolizę.

W podobny sposób białko PKM2 jest zaangażowane w proces angiogenezy w guzie nowotworowym. Badania przeprowadzone na komórkach raka trzustki wykazały, że PKM2 po translokacji do jądra, oddziałuje z NF- κ B oraz HIF-1, przez co dochodzi do włączenia ekspresji białka VEGF-A, który jest niezbędny do tworzenia nowych naczyń krwionośnych. Kolejną charakterystyczną cechą komórek nowotworowych jest ich zdolność do migracji oraz inwazji. Białko PKM2 bierze udział w kaskadzie przekazywania sygnałów, która prowadzi do nabycia przez komórki nowotworowe zdolności do inwazji.

Wymienione wyżej przykłady funkcji białka PKM1 i PKM2 w różnych komórkach sugerują, że białka te mogą być interesującym celem dla opracowywania nowych terapii przeciwnowotworowych.

Celem badań była optymalizacja narzędzi terapeutycznych, które mogą mieć zastosowanie w regulacji alternatywnego splicingu genu *PKM*. Ze względu na fakt, że izoforma PKM2 pojawia się w komórkach nowotworowych jako skutek zmian w regulacji alternatywnego splicingu genu *PKM*, autorka dysertacji podjęła próbę przekierowania alternatywnego splicingu na zwiększoną produkcję izoformy PKM1.

W badaniach swoich zastosowała dwa typy narzędzi molekularnych.

Pierwsze to dwufunkcyjne oligonukleotydy antysensowe (ang. *bifunctional antisense oligonucleotides*, BASOs), które składają się z części antysensownej odpowiedzialnej za przyłączenie oligonukleotydu do docelowej sekwencji pre-mRNA. Oraz części regulatorowej, która jest rozpoznawana przez czynniki splicingowe. Zastosowanie odpowiedniej sekwencji regulatorowej umożliwia ściągnięcie czynników splicingowych w pobliże regulowanej sekwencji pre-mRNA.

Drugi typ zastosowanych narzędzi to, oligonukleotydy antysensowe zmieniające splicing (ang. *splice switching oligonucleotides*, SSOs) komplementarnie z sekwencjami regulatorowymi w pre-mRNA które po hybrydyzacji z tą sekwencją uniemożliwiają na oddziaływanie z czynnikami splicingowymi, które wpływają na regulację/zajście procesu splicingu.

W pracy Pani magister Natalia Bartyś przeprowadziła optymalizację działania obu potencjalnych narzędzi terapeutycznych, w celu zmiany poziomu między obu formami splicingowymi. Przetestowała również wpływ tych modyfikacji ekspresji obu form genu *PKM* na zdolność do migracji i inwazji komórek nowotworowych.

Układ pracy jest zgodny z zasadami redagowania rozpraw doktorskich. Treść odpowiada tematowi określonymu w tytule. Rozprawa została podzielona na standardowe w pracach biologicznych rozdziały. Nazwa rozdziału „Przegląd literatury” troszkę różni się od klasycznej w tym przypadku nazwy „Wstęp” ale wydaje mi się, że może być zamiennie stosowana. Rozdział ten podobnie jak cały tekst dysertacji jest syntetycznie napisany i stanowi świetne wprowadzenie do badań. Cel pracy jaki w tej pracy został postawiony jest bardzo ambitny, a uzyskane wyniki są w pełni oryginalne i ciekawe. Część rozprawy dotycząca stosowanych przez Autorkę dysertacji materiałów i metod opisana jest z dokładnością wystarczającą do powtórzenia eksperymentów, bez nadmiernej

szczegółowości, z dbaniem o sedno sprawy. Użyte w tekście pracy tabele i ryciny dobrze uzupełniają treści zawarte w rozdziałach.

Do najważniejszych wyników pracy należy zaliczyć:

- Wybór i optymalizacja dwóch efektywnych sekwencji regulatorowych BASO.
- Wybranie najlepszej liczby powtórzeń motywów RNA wiążących białka regulatorowe.
- Wykazanie zasadności użycia rozgałęzień oligonukleotydu, w celu maksymalizacji efektu regulatorowego dla sond BASO
- Skuteczne przetestowanie efektywności działania oligonukleotydów BASO na odrębnych liniach komórkowych.
- Uzyskanie bardzo obiecujących wyników przy zastosowaniu zmodyfikowanych nukleotydów podczas optymalizacji SSO, szczególnie przy zastosowaniu nukleotydów LNA.

Uwagi:

Badania przedstawione w tej rozprawie wpisują się w najlepszy nurt badań eksperymentalnych w biologii i biomedycynie. Należy podziwiać zaplanowanie oraz logikę prowadzonych kolejnych eksperymentów, które pozwoliły na uzyskanie bardzo ciekawych wyników. Wyniki te pozwoliły na napisanie bardzo ciekawego rozdziału Wyniki i dyskusja, który pokazuje dojrzałość naukową Autorki. Tak jak w każdym obszernym tekście, obecne są naprawdę nieistotne drobne błędy edytorskie, które są nie do uniknięcia.

Nie mam istotnych uwag do pracy i z przyjemnością wysłucham referatu oraz obrony doktoratu. Na koniec z ciekawości mam do Autorki tej rozprawy pytanie:

W dyskusji autorka podjęła problem potencjalnego oddziaływania, szczególnie sond SSO na inne geny poza docelowym genem *PKM*. Czy poza analizą ekspresji metodą RT-qPCR była lub jest planowana analiza całych zmienionych transkryptomów badanych komórek. Byłoby to istotne również z punktu widzenia potencjalnego zastosowania terapeutycznego.

Rozprawa doktorska Pani magister Natalii Bartyś zawiera ważne i oryginalne wyniki, świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu doktorantki do prowadzenia badań.

W podsumowaniu, na podstawie dokonanej wysoce pozytywnej oceny rozprawy doktorskiej, stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie Panią magister Natalię Bartyś do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na wysoką wartość poznawczą badań, uznaję prace za wyróżniającą się i pozwalam sobie złożyć wniosek do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o wyróżnienie tej rozprawy stosowną nagrodą.



dr hab. Dariusz Jan Smoliński, prof. UMK