



Prof. dr hab. Krzysztof Sobczak
Zakład Ekspresji Genów

Poznań, 13 lutego 2023

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Natalii Bartyś zatytułowanej „Optymalizacja potencjału oligonukleotydów antysensowych w regulacji alternatywnego splicingu w nowotworowych liniach komórkowych”

Niniejszą recenzję wykonałem jako osoba powołana do funkcji recenzenta przez Radę Naukową Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (IChB PAN). Oceny dokonałem według obowiązujących uregulowań prawnych na podstawie przekazanej mi rozprawy doktorskiej.

Praca doktorska mgr Natalii Bartyś została wykonana w Zakładzie Bioinżynierii Kwasów Nukleinowych IChB PAN w Poznaniu pod opieką merytoryczną prof. IChB PAN, dr hab. Anny Pasternak, pełniącej funkcję promotora oraz dr inż. Jolanty Lisowiec-Wąchnickiej pełniącej rolę promotora pomocniczego w przewodzie doktorskim. W macierzystym zespole od wielu lat prowadzone są z dużym sukcesem badania nad zastosowaniem kwasów nukleinowych i ich analogów jako potencjalnych czynników terapeutycznych, zwłaszcza jako narzędzi interferencji RNA, aptamerów lub różnego typu oligonukleotydów antysensowych. Oceniana praca doktorska wpisuje się właśnie w ten nurt badań.

Szczególnymi obiektami badań doktorantki były modyfikowane antysensowe oligonukleotydy nacelowane na regulację alternatywno splicingu pre-mRNA genu *PKM*. mRNA tego genu mogą mieć wariantywnie włączony ekson 9 lub 10, co skutkuje powstawaniem dwóch nieznacznie różniących się strukturalnie izoform białkowych kinazy pirogronianowej, odpowiednio PKM1 i PKM2, które różnią się zdolnością formowania di- i tetra-merów. Ta z kolei różnica decyduje o tym czy komórka zdobywa energię głównie na drodze glikolizy czy oddychania tlenowego, czy wykorzystuje fosfoenolopirogronian do rozmaitych szlaków biosyntezy. Prawidłowa dystrybucja tych dwóch izoform białkowych ma zatem istotny wpływ na metabolizm różnych typów komórek. W nowotworach zaobserwowano znaczący wzrost ilości izoformy PKM2. Dlatego też nadrzędnym celem ocenianej pracy było zaprojektowanie i przetestowanie różnych typów oligonukleotydów antysensowych wiążących się do sekwencji eksonu 10 lub przyległego fragmentu intronu 9 w celu ograniczenia włączania tego eksonu do mRNA w procesie splicingu, a w konsekwencji do obniżenia ilości izoformy mRNA, a co za tym idzie izoformy białkowej PKM2.

Oceniana rozprawa doktorska składa się z trzech głównych części. Pierwsza zawiera bardzo konkretnie nakreślony cel badań. Drugą stanowi niezbyt obszerny, liczący 28 stron,



wstęp omawiający istniejący stan wiedzy w zakresie tematyki projektu. Doktorantka opisuje mechanizm splicingu RNA, z szczególnym uwzględnieniem alternatywnego splicingu. Dalej przybliży główny obiekt badań jakim jest gen *PKM* oraz jego izoformy splicingowe mRNA i białka, zwłaszcza w kontekście różnic funkcjonalnych i udziału w procesie nowotworzenia. Część ta choć krótka napisana jest w sposób bardzo kompetentny i informatywny, a przygotowane przez Doktorantkę ryciny bardzo ułatwiają zrozumienie nieraz złożonych mechanizmów molekularnych. Może jedynie nieco zabrakło szerzej przedstawionych informacji o zmianach ekspresji *PKM* w nowotworach, zwłaszcza w kontekście ilościowym (np. krotności zmian izoform), ale również o tym czy te zaburzenia dotyczą wszystkich typów nowotworów oraz czy są odmienne w różnych fazach rozwoju nowotworu. Tutaj chciałbym również zwrócić uwagę na kilka drobiazgów. We wstępie napisano, że miejsca 5'ss i 3'ss są definiowane przez więcej niż jedną sekwencję konserwatywną. Jest to określenie nieprecyzyjne. Lepiej napisać o sekwencjach o niskim zakonserwowaniu lub niskiej zachowawczości. Nie ma też składania czy splicingu genu, ale pre-mRNA. W genie *SMN2* nie pojawiają się mutacje, ale są zmiany nukleotydowe odróżniające go od *SMN1*, a skutkujące pomijaniem eksonu 7 w splicingu jego pre-mRNA (s. 27). Na Rycinie 9A błędnie zaznaczono U1 przy miejscu 3'ss, a powinno być zaznaczone przy miejscu 5'ss alternatywnego eksonu. Ponadto na str. 42 jest napisane, że „Nusinersen oddziałuje z sekwencją wyciszającą splicing w eksonie 7 genu *SMN2*”. Nusinersen wiąże się z sekwencją ISS w intronie 7 tego genu.

Trzecim, najobszerniejszym elementem rozprawy jest drobiazgowy opis zasadniczej części pracy, rozpoczynający się przedstawieniem i przedyskutowaniem uzyskanych wyników prowadzonych badań, a kończący się opisem metodyki badawczej. Jest to dość tradycyjny układ rozprawy pozwalającym na logiczne wprowadzanie poszczególnych treści. Na uwagę zasługuje bardzo klarowny opis poszczególnych podrozdziałów, w których znajduje się krótkie wprowadzenie ukazujące celowość podjęcia konkretnych zadań badawczych, a kończy konkluzja nie wykraczająca w większości przypadków poza realny wynik przeprowadzonych eksperymentów. Jednocześnie konkluzjom towarzyszy dyskusja z wynikami innych, wcześniej opublikowanych badań.

Celem pierwszej części realizowanych badań było zaprojektowanie dwumodułowych oligonukleotydów antysensowych typu BASO do efektywnej regulacji alternatywnego splicingu pre-mRNA genu *PKM*. Docelowo w części regulatorowej oligomerów miałyby się znaleźć sekwencje RNA wiążące czynnik splicingowy hnRNP A1, znany jako negatywny regulator alternatywnego splicingu. Dlatego na początku poszukiwano sekwencji RNA, które efektywnie wiążą rekombinowane białko hnRNP A1 w testach *in vitro*. Do dalszych badań komórkowych zastosowano wyselekcjonowaną sekwencję D4, która zawiera 4-krotnie powtórzony motyw sekwencyjny 5'-UAGGU-3' i ma potencjał tworzenia kwadrupleksu G w niskich temperaturach przy bardzo wysokim stężeniu RNA. W większości ta część projektu została dobrze zaplanowana i wykonana.



Mam jednak kilka uwag natury semantycznej i interpretacyjnej. Na stronach 51 i 52 Autorka pisze, że badała wartość K_d . Wydaje mi się, że nie jest to wprost stała dysocjacji odnosząca się do warunków fizjologicznych, ponieważ wartość K_d dla oddziaływania badanych RNA z białkiem w komórce jest z pewnością znacznie niższa (spodziewałbym się niskich wartości nanomolowych). Obserwacje poczynione w pracy wynikają wprost z warunków eksperymentalnych, w których zastosowano aż $0,5 \mu\text{M}$ stężenie RNA. Ponadto mowa jest wielokrotnie o wyższym lub niższym powinowactwie białka do RNA, ale nie wynika to wprost z danych przedstawionych na rysunku 14, gdzie nie znajdujemy wyników analizy statystycznej. Przy tak małych różnicach wartości trudno wprost mówić o różnicach ilościowych. Sądzę, że większe różnice można by zaobserwować dla stężeń RNA poniżej 1 nM , ale również dla fizjologicznej temperatury. Z wykresów krzywych topnienia wynika, że w warunkach fizjologicznej temperatury większość testowanych RNA nie powinno tworzyć struktur kwadrupleksów G ani struktur typu spinki do włosów (wyjątkiem jest cząsteczka B2). Zastanawia mnie dlaczego eksperymenty EMSA prowadzono w 4°C ? Ponadto dlaczego sygnał w kompleksach RNA/białko sięgał maksymalnie 60%?

Celem drugiej części pracy było poszukiwanie miejsc wiązania antysensowych oligonukleotydów, które mogą wywoływać selektywne wyłączenie eksonu 10 w mRNA PKM. Zsyntetyzowano więc pięć BASO komplementarnych do regionu pre-mRNA PKM na połączeniu intronu 9 i eksonu 10. Jako kontrolę efektu domeny regulatorowej BASO zastosowano antysensowe ASO wiążące się w tym samym miejscu pre-mRNA, ale pozbawione sekwencji regulatorowej D4. Pomiar stosunku izoform PKM2/PKM1 wykazał brak efektu działania BASO1, 2 i 5 i prawdopodobnie całkiem silny efekt działania BASO3 i 4. To są jednak domniemania z mojej strony, ponieważ na rycinie 17 nie przedstawiono analizy statystycznej dla odpowiednich porównań. W dalszej części pracy wykazano również, że mniejsza liczba powtórzeń sekwencji 5'-UAGGU-3', tworzących część regulatorową BASO, a mianowicie 2 i 3 powoduje lekki efekt na inhibicję włączania eksonu 10. W tej części również kilka sformułowanych konkluzji nie znajduje odzwierciedlenia w analizach statystycznych. Na przykład z rysunku 18B trudno o jakiegokolwiek konkluzje. Istotność statystyczną pokazuje jedynie jedno porównanie.

Najciekawsze wyniki przyniosły eksperymenty wykorzystujące rozgałęzione BASO (tzw. bBASO) z różnymi sekwencjami regulatorowymi. Zastosowanie BASO4-2xD4 oraz BASO4-2xA3 jednoznacznie pokazało istotny wzrost poziomu izoformy PKM1 przy istotnym ubytku izoformy PKM2. Częściowo ten efekt był również obserwowany w komórkach SKOV-3. Tutaj jednak ponownie interpretacja uzyskanych wyników wykracza poza faktyczny wynik eksperymentalny. Doktorantka pisze, że w tej linii komórkowej dochodzi do ubytku izoformy PKM2, jednak żaden wynik nie jest istotny statystycznie (rycina 24). Tutaj rodzi się więc pytanie jak można zinterpretować uzyskany wynik – wzrost poziomu PKM1 przy braku zmiany poziomu PKM2 – zwłaszcza, że oligonukleotydy wiążą się do eksonu 10, a zatem izoformy PKM2. Podobnie zaskakujący jest brak korelacji zmian splicingowych eksonów 9 i 10 względem migracji i inwazji



komórek nowotworowych. Prosiłbym o ustosunkowanie się do tej kwestii w trakcie publicznej obrony tez rozprawy doktorskiej. W tej części pracy zabrakło mi ważnej kontroli w postaci żywotności komórek poddanych działaniu testowanych oligomerów. Jeśli, któryś z BASO wpływa na żywotność/liczebność komórek to może się to przełożyć na pozorną zmianę migracji/inwazji. Ponadto referencją w tym eksperymencie były komórki nie poddawane działaniu ASO. Kontrolą powinny być komórki poddane działaniu podobnych chemicznie oligomerów nie wykazujących oddziaływania z żadnymi RNA.

W ostatniej części pracy zbadano efekt wprowadzenia pojedynczych lub kilku modyfikowanych reszt nukleotydowych w postaci stabilizujących kompleks LNA i destabilizujących UNA. Badania pokazały, że wprowadzenie trzech reszt LNA w ASO11 wywiera jednoznacznie pozytywny efekt na profil splicingowy w mRNA *PKM* – dochodzi do wzrostu izoformy PKM1 i spadku poziomu izoformy PKM2. W tej części badań doktorantka pokazała, że praca nad wyborem nie tylko docelowego miejsca rozpoznawanego przez SSO w pre-mRNA, ale również sama natura chemiczna SSO są istotnymi czynnikami, które należy uwzględnić w opracowaniu skutecznych reagentów wpływających na efektywne przełączanie alternatywnego splicingu.

W częściach wstęp i wyniki zwróciłem uwagę na występowanie wielu określeń żargonowych lub kalek językowych. Na przykład:

- „przeprowadzono topnienia w świetle UV” - lepiej byłoby napisać, że eksperymenty topnienia struktur RNA monitorowane były z zastosowaniem światła UV,
- „przekierowanie maszyny składania genów na ekson 9” czy „zmianę wzorca splicingu” - wzoru splicingowego lub profilu splicingowego.

Kalką z angielskiego są na przykład określenia „G-kwadrupleks” lub „G-tetrada”. Lepiej zastosować określenia kwadrupleks G czy tetrada G. Po polsku lepiej też mówić koniec N i koniec C białka, a nie N-koniec, czy C-koniec.

Zawartość ocenianej pracy doktorskiej została już częściowo opublikowana w 2022 roku w *Molecules* (IF₂₀₂₂ 4,9) - Bartyś N, Pasternak A, Lisowiec-Wąchnicka J. Optimization of Bifunctional Antisense Oligonucleotides for Regulation of Mutually Exclusive Alternative Splicing of PKM Gene. *Molecules*. 2022 Sep 3;27(17):5682 (doi: 10.3390/molecules27175682). Mgr Bartyś jest pierwszym autorem tej pracy. Część dysertacji została więc już wnikliwie oceniona przez ekspertów z obszaru tematycznego projektu.

Z dogłębnej analizy wszystkich elementów rozprawy doktorskiej jasno wynika, że Mgr Bartyś w sposób dogłębny przestudiowała zagadnienia dotyczące chemicznej natury modyfikowanych kwasów nukleinowych i ich analogów jako potencjalnych cząstek terapeutycznych oraz ich zastosowania w modulacji splicingu RNA. Chcąc jak najlepiej zrealizować założone cele badawcze, Doktorantka zaplanowała logiczny ciąg poszczególnych



etapów badań. Pokazała, że potrafi w sposób kompetentny skorzystać z rozmaitych narzędzi badawczych, takich jak biofizyczne monitorowanie struktur RNA, biochemiczna analiza interakcji RNA z białkami czy monitorowanie efektu biologicznego wprowadzanych do komórek kwasów nukleinowych. W większości zinterpretowała w sposób właściwy uzyskane wyniki (wyłączając zastrzeżenia opisane powyżej). Dyskusja obserwacji eksperymentalnych przeprowadzona została w wyważony sposób. Praca doktorska jest solidna i odpowiada na kilka bardzo ważnych pytań biologicznych. Wskazane powyżej uchybienia i wątpliwości interpretacyjne nie wpływają w istotny sposób na moją wysoką ocenę niniejszej rozprawy.

Wnioski końcowe

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa mgr Natalii Bartyś spełnia wszystkie warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z dnia 30 sierpnia 2018 r., poz. 1668, z późniejszymi zmianami), Ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, oraz w Sposobie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w IChB PAN w Poznaniu. Zapoznając się z rozprawą odczuwałem satysfakcję zetknięcia się z rzetelnie i kompleksowo prowadzonymi badaniami, które doprowadziły do sformułowania kilku wniosków istotnych z poznawczego punktu widzenia. Mgr Bartyś wykazała się wiedzą teoretyczną z zakresu prowadzonych przez siebie badań. Udowodniła, że potrafi rozwiązać problem naukowy poprzez odpowiednie zaplanowanie badań, wykonanie doświadczeń oraz interpretację ich wyników. Uzyskała istotne wyniki, poprawnie je opisała i wyciągnęła uprawnione wnioski. Dlatego też z całym przekonaniem zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu o dopuszczenie mgr Natalii Bartyś do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Krzysztof Sobczak