



Warszawa, 13 lutego 2023

Recenzja pracy doktorskiej mgr Natalii Bartyś pt. „Optymalizacja potencjału oligonukleotydów antysensowych w regulacji alternatywnego splicingu w nowotworowych liniach komórkowych”

Praca doktorska mgr Natalii Bartyś została wykonana w Zakładzie Bioinżynierii Kwasów Nukleinowych Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Promoterem pracy jest dr hab. Anna Pasternak, prof. ICHB PAN, a promotorem pomocniczym dr inż. Jolanta Lisowiec-Wąchnicka. Praca ta została wykonana w ramach projektu Interdyscyplinarnych Studiów Doktoranckich 'NanoBioTech' realizowanym przez Politechnikę Poznańską, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, oraz Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk.

Praca dotyczy optymalizacji metody regulacji alternatywnego splicingu genu PKM (kinazy pirogronianowej) polegającej na przyłączaniu sekwencji regulatorowych wiążących białko hnRNP A1 w określonych miejscach pre-mRNA, w pobliżu miejsc splicingowych determinujących wzór splicingu PKM1 (zawiera egzon 9, pomija egzon 10) lub PKM2 (pomija egzon 9, zatrzymuje egzon 10). Za zahamowanie włączania egzonu 9 (czyli wzór splicingu produkujący izoformę PKM2) odpowiedzialne jest m.in. białko hnRNP A1, więc obniżenie poziomu tego białka prowadzi do podwyższenia poziomu izoformy PKM1. Ponieważ nadekspresja izoformy PKM2 jest obserwowana w wielu nowotworach (n.p. trzustki, piersi, prostaty, jajnika) i stymuluje rozwój i progresję nowotworów, modulowanie przebiegu alternatywnego splicingu w kierunku zahamowania produkcji PKM2 na korzyść zwiększenia produkcji PKM1 jest ważnym celem badań prowadzących do przyszłych zastosowań terapeutycznych.

Motywnym wiodącym ocenianej pracy jest wypracowanie metody przyłączania sond do ściśle określonych miejsc w pre-mRNA zmieniających przebieg splicingu w przewidywalny sposób. Antysensowe sondy wiążące się do specyficznych miejsc zawierają jednocześnie motywy rozpoznawane przez białko hnRNP A1. HnRNP A1 jest jednym z głównych czynników wyciszających splicing przez hamowanie oddziaływania U1 z sekwencją 5'SS. Mechanizm ten wymaga wiązania hnRNP A1 w pobliżu negatywnie regulowanego miejsca 5'SS.

Przedstawione wyniki obejmują szeroki wachlarz analizowanych oligonukleotydów przyłączanych do dokładnie wybranych miejsc w okolicy egzonu 10 (egzon 10 i poprzedzająca go sekwencja intronu 9). Analiza objęła zarówno optymalizację antysensowej sekwencji (lokalizacja miejsca przyłączania, modyfikacja stabilności wiązania przez użycie LNA, UNA) jak i szeroka analiza różnych rodzajów dwu-funkcyjnych oligos (BASO) złożonych z części antysensowej i sekwencji wiążącej hnRNP A1. Doświadczenia te objęły zbadanie wpływu

rodzaju motywu rozpoznawanego przez białko jak i ilości powtórzeń tego motywu, a nawet użycie rozgałęzionych BASO w których do jednej sekwencji antysensowej przyłączone są dwa łańcuchy.

Rozprawa doktorska zawiera ciekawe, dobrze zaplanowane doświadczenia, bazujące na nowoczesnych technologiach syntezy modyfikowanych oligonukleotydów. Użycie mostka glicerolowego do uzyskania rozgałęzienia w BASO 2x (gdzie do jednej sekwencji antysensowej dołączone są dwa łańcuchy z motywami wiązаныmi przez hnRNP A1) jest bardzo ciekawym rozwiązaniem. Mam nadzieję, że tego typu oligonukleotydy zostaną jeszcze dokładniej zbadane – wydaje mi się, że mogą mieć szerokie zastosowanie w różnych badaniach. Podobnie modulacja specyficzności wiązania oligonukleotydów do zbliżonych sekwencji w okolicy egzonu 9 i 10 przekonująco dowiodła, że to wiązanie hnRNP A1 do sekwencji w egzonie 10 jest limitujące i decyduje o wyborze wzoru alternatywnego splicingu. Użycie modyfikacji LNA i UNA do precyzyjnego kontrolowania stabilności oddziaływania oligonukleotydów z podobnymi sekwencjami w egzonach 9 i 10 jest bardzo ciekawym zastosowaniem znajomości chemii kwasów nukleinowych do uzyskiwania precyzyjnie określonych efektów specyficznych oddziaływań syntetycznych sond z pre-mRNA.

Ponieważ przedstawione wyniki są bardzo ciekawe, pozostałą część opinii przedstawiam w formie uwag i pytań, na które chciałabym chociaż częściowo rozwinąć w trakcie obrony:

1. Specyficzność wiązania białka hnRNP A1 jest stosunkowo niska i białko to rozpoznaje szeroką gamę sekwencji. Wybór optymalnych motywów zastosowanych do sond BASO oparty został na teście przesiewowym wielu motywów wybranych z danych literaturowych. Szkoda, że nie zostały podane wartości K_d wiązania BASO z pojedynczymi miejscami wiązania hnRNP A1 (t.j. z jednym powtórzeniem sekwencji regulatorowej) – nie można więc porównać efektów zwielokrotnienia powtórzeń.
2. Rys. 13 pokazuje przykład eksperymentu pozwalającego na określenie K_d . Jaki oligonukleotyd został użyty w tym doświadczeniu? Przy wyższych stężeniach białka (60-1.5 μM) widać wyraźnie, że powstaje kompleks wiążący dwie cząsteczki białka (2:1 białko:oligo), już przy 10 μM stężeniu białka widać zarówno dimer (2:1) jak i monomer (1:1), a przy stężeniach białka poniżej 1 μM powstaje już tylko monomer. Jeśli poprawnie odgaduję interpretację pokazanego wyniku, konkluzje tego wyniku powinny być dokładnie przedyskutowane i wzięte pod uwagę przy omawianiu i planowaniu innych wyników.
3. Ogólnie uznawany model działania sond BASO polega na negatywnym działaniu białka hnRNP A1 przyłączonego do części regulatorowej na pobliskie miejsce splicingowe. Model ten zakłada, że obecność białka w pobliżu 5'SS wystarcza do zaobserwowania negatywnej regulacji przez hnRNP A1, ale to może być uproszczony model sprawdzający się tylko w określonych przypadkach. Sam sposób przyłączenia białka do oligonukleotydu (np. wiązanie przez jedną czy dwie domeny RRM) może determinować funkcjonalność jego oddziaływań z U1 do 5'SS. Być może dłuższe motywy (np. A [CAGGUAAGU], B [CAGGUGAGU]) angażują domeny RRM inaczej niż krótkie (C [UAGGA], D [UAGGU]). Dłuższe motywy (A, B) mogą zawierać dwa miejsca wiązania (np. CAGGU + AAGU), tak że mogą de facto wiązać dwie domeny RRM. Zauważmy, że

sekwencja 12 pokazana w Tabeli 2 jest podobnym, krótkim motywem UAGA, a sekwencje AAGU czy GAGU (czyli 3' końcowe części motywów A i B) jako takie nie były sprawdzone.

4. W tym kontekście zastanawia mnie, że przy planowaniu różnych form powtórzonych motywów (A2, A3, B2, B3, ale też C2, C4, D2, D4) nie sprawdzono wpływu odstępów pomiędzy powtórzeniami – jeśli białko rozpoznające długi motyw np. angażuje dwie domeny RRM, to wiązane drugiej cząsteczki białka do sąsiedniego motywu może wymagać większego odstępu między motywami. Podobnie, powinowactwo wiązania jednej domeny RRM oddziałującej z motywem np. w C4 czy D4 może zależeć od 'gęstości' rozmieszczenia poszczególnych motywów w dłuższym oligonukleotydzie. Wnioski takie nasuwają się z analizy struktur hnRNP A1 w kompleksach z oligonukleotydami – struktura krystaliczna kompleksu jednoniciowego DNA (sekwencja telomerowa) (Ding et al., 1999) pokazuje obie domeny RRM wiążące się do 10 nt sekwencji TAGG(G)TTAGG (gdzie G5, w nawiasie, nie tworzy oddziaływań z białkiem). Przy braku informacji na temat różnic w Kd między wiązaniem A1 i A2/A3 trudno wykluczyć tę możliwość. Generalnie brakuje mi głębszej dyskusji wniosków wynikających z istniejących struktur białka hnRNP A1.
5. Nie jestem pewna, czy dobrze rozumiem zasadniczy mechanizm hamowania splicingu przez sondy BASO wiążące hnRNP A1. Zasadniczo, zwiększanie ilości miejsc wiązania białka w części regulatorowej zwiększa tylko prawdopodobieństwo, że jedna z cząsteczek hnRNP A1 znajdzie się w odpowiedniej odległości od 5'SS i w odpowiedniej konformacji żeby doszło do (słabo zresztą zrozumianego) zahamowania wiązania U1 z 5'SS. Czyli formalnie fakt, że zwiększanie ilości miejsc wiązania (np. dla BASO C4x2) daje lepsze wyniki świadczy o tym, że cały ten kompleks potencjalnie wielu związanych cząsteczek białka może nie zawierać hnRNP A1 optymalnie związanego do interakcji z U1.
6. Str. 52: „w grupie A długość oligonukleotydów nie wpływa na siłę wiązania z białkiem (Rys. 14). W tym doświadczeniu analizowana była nie tyle długość oligonukleotydu, ile ilość powtórzeń motywu A. Wpływ długości oligonukleotydu na wiązanie białka hnRNP A1 powinien być badany przez wydłużanie A1 przez sekwencje nie zawierające motywu CAGGUAAGU. Czy fakt, że zwiększanie ilości powtórzeń nie wpływa na siłę wiązania nie sugeruje, że poszczególne powtórzenia mogą być zlokalizowane zbyt blisko siebie, przeciwdziałając jednoczesnemu wiązaniu białka do sąsiadujących ze sobą miejsc?
7. Nie rozumiem założenia, że hnRNP A1 wiąże się do struktury G-kwadrupleksu. Po pierwsze, generalnie domeny RRM wiążą się do jednoniciowych miejsc wiązania (i tak wygląda struktura krystaliczna, podczas gdy dane dotyczące struktury G-kwadrupleksu w kompleksie z hnRNP A1 są dla mnie mniej przekonujące), po drugie, jeśli rozumiem wykres krzywej topnienia w 295 nm (Rys. 15A), to nawet jeśli taka struktura powstaje, to w temp. 30-37°C (np. w komórce) istnieje też duża pula formy jednoniciowej. Oczywiście, zależeć to też będzie od warunków, soli, itp. Krzywa topnienia w 295 nm powinna być lepiej wytłumaczona. Rozumiem, że bada się wtedy sygnał oddziaływań Hoogsteen, ale brak mi głębszego zrozumienia co

konkretnie przedstawia ten wynik i jak należy go interpretować. Brakuje mi też negatywnej kontroli dla oligonukleotydu nie tworzącego G-kwadrupleksu (np. A2).

8. Zastosowanie łącznika glicerolowego do przyłączenia dwóch oligonukleotydów regulatorowych do jednego oligonukleotydu antysensowego jest bardzo ciekawym pomysłem. Czy przetestowany został jakiś kontrolny rozgałęziony BASO nie zawierający żadnych sekwencji regulatorowych, żeby stwierdzić czy samo rozgałęzienie łącznikiem glicerolowym nie wpływa na splicing? Nie znalazłam informacji na temat syntezy rozgałęzionych oligonukleotydów – kto je przygotował, w jaki sposób, i jak wygląda ich struktura?
9. Rozprawa jest ogólnie dobrze napisana, kompletna i logiczna, ale np. dość dowolne zasady stosowania interpunkcji czy szyku zdania miejscami utrudniają zrozumienie tekstu. Znalazłam też drobne błędy i nieścisłości:
 - Rysunek 9A sugeruje, że U1 wiąże się z 3'SS (a nie z 5'SS).
 - Rozumiem, że stosowanie polskiego nazewnictwa naukowego nie jest proste, ale nie jestem pewna czy niektóre sformułowania wynikają z niezgrabności nazewnictwa czy niezrozumienia procesu. Co znaczy określenie 'miejsce cięcia' w odniesieniu do np. 3'SS? Pojęcie cięcia RNA jest dla mnie zarezerwowane dla hydrolytycznych reakcji (RNazy itp.). W przypadku splicingu mamy do czynienia z transesteryfikacją, a więc zamianą wiązań fosfodwuestrowych.
 - str. 20: co to jest 'centrum fosforowe' miejsca splicingowego? Ten termin powinien zostać zdefiniowany.
 - str. 20: *'Teoria definicji eksonu mówi o tym, że czynniki białkowe zaangażowane w proces splicingu rozpoznają miejsca cięcia okalające krótkie eksony'*. Czy rzeczywiście tego dotyczy teoria 'exon definition'?
 - str. 22: *'Cząsteczka mRNA bez sekwencji niekodujących jest uwalniana..'*. Czy sekwencje 5' i 3' UTR w cząsteczce mRNA są sekwencjami kodującymi?
 - Stwierdzenie typu *'BASO1-D4 hybrydyzuje w intronie 9'* nie jest poprawne. Podobnie w innych miejscach, np. na str. 21, czytamy, że *'U2 snRNP hybrydyzuje z miejscem rozgałęzienia'*. Tworzenie dupleksu RNA:RNA nie jest hybrydyzacją.

Praca ma dobry, wprowadzający w zagadnienia wstęp, dobrze opisane materiały i metody, oraz wspólną część opisującą wyniki i dyskusję. Większość doświadczeń została przeprowadzona z odpowiednimi kontrolami, a wyniki są interesująco zinterpretowane. Praca ta została wykonana starannie, z dużą znajomością technik syntezy i analizy oligonukleotydów RNA. Najważniejszym osiągnięciem tej pracy jest dostarczenie konkretnych oligonukleotydowych sond mogących posłużyć do regulacji przebiegu alternatywnego splicingu pre-mRNA kinazy pirogronianowej PKM. Przeprowadzone badania stanowią więc ważny krok w opracowaniu praktycznych, funkcjonalnych metod terapeutycznych.

Praca doktorska mgr Natalii Bartyś wnosi ważne dla nauk biologicznych informacje pogłębiające nasze zrozumienie mechanizmów regulacji alternatywnego splicingu i prowadzące do przyszłych zastosowań terapeutycznych. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.), Ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy

wprowadzając ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.) oraz w Sposobie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (uchwała Rady Naukowej ICHB PAN nr 128/2022/Internet z dnia 24 października 2022 r.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie mgr Natalii Bartyś do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.



Magda Konarska