

Warszawa, 26-05-2024

dr hab. Roman Szczęsny

Pracownia Biologii RNA

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

***Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Julii Latowskiej-Łysiak
"Charakterystyka wybranych kolistych RNA w glejaku wielopostaciowym
- biogeneza kolistych RNA i ich potencjalne funkcje"***

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Julii Latowskiej-Łysiak została wykonana w Zakładzie Neuroonkologii Molekularnej Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk. Prace badawcze zostały przeprowadzone pod kierunkiem dr hab. Katarzyny Rolle, prof. ICHB PAN.

Choroby nowotworowe stanowią znaczące wyzwanie dla współczesnej medycyny. Rozwój badań podstawowych oraz translacyjnych pozwala coraz lepiej zrozumieć biologię poszczególnych chorób oraz zaproponować odpowiednie terapie. Niestety, dotychczas w wielu przypadkach nie udało się opracować skutecznych strategii terapeutycznych. Takim przykładem jest glejak wielopostaciowy, który należy do najbardziej agresywnych i śmiertelnych nowotworów ośrodkowego układu nerwowego. Poznanie biologii glejaka wielopostaciowego oraz mechanizmów prowadzących do jego powstania i rozprzestrzenienia ma duże znaczenia poznawcze oraz aplikacyjne. Badania przeprowadzone przez mgr Julię Latowską-Łysiak dotyczą tego interesującego i ważnego obszaru badań.

Z wcześniejszych prac badawczych wiadomo było, że komórki glejaka wielopostaciowego charakteryzują się zmianami w ekspresji niekodujących RNA, w tym kolistych RNA. Ta klasa cząsteczek RNA znalazła się w obszarze szczególnego zainteresowania Doktorantki, która postanowiła zbadać profil ekspresji kolistych RNA w glejaku wielopostaciowym, a następnie podjęła się próby ustalenia roli wybranych kolistych RNA w rozwoju i progresji badanego nowotworu. Cel rozprawy uważam jako wysoce interesujący i ważny dla zrozumienia nie tylko biologii glejaka wielopostaciowego, ale również biogenezy i regulacji kolistych RNA.

W pierwszym etapie badań mgr Julia Latowska-Łysiak przeprowadziła analizę kolistych RNA w materiale pochodzącym od pacjentów chorych na glejaka wielopostaciowego. Uzyskane wyniki wskazały znaczące zmiany w profilu ekspresji wielu kolistych RNA w porównaniu do transkryptomu osób zdrowych. Doktorantka zaobserwowała również tendencję, że zwiększonej ekspresji kolistej formy RNA towarzyszy wzrost poziomu jej liniowego odpowiednika, przy czym, stopień tej zależności jest zróżnicowany i zależy od danego genu. Co ważne, Autorka nie tylko potwierdziła wcześniejsze obserwacje, że rozwój glejaka jest związany lub spowodowany zmianami w profilu ekspresji kolistych RNA, ale także zidentyfikowała nowe, dotychczas nieopisane koliste RNA. Dane uzyskane z użyciem

sekwencjonowania NGS zostały potwierdzone z użyciem techniki ilościowego PCR. Co ciekawe, porównanie ekspresji kolistych RNA w guzie pierwotnym i wtórnym wskazało na różnicową ekspresję tylko trzech kolistych RNA. Sugeruje to, że zmiany w profilu ekspresji kolistych RNA mają niewielki wpływ na progresję glejaka. Niemniej, jak podkreśla Doktorantka niewielka liczba prób guza wtórnego utrudnia stawianie jednoznacznych wniosków.

Biorąc pod uwagę dotychczasowe doniesienia o roli białek wiążących RNA (RBP) w biogenezie kolistych RNA Doktorantka przeprowadziła analizę ekspresji genów kodujących te białka wykorzystując materiał pochodzący z guzów oraz kontroli stanowiącej RNA wyizolowany ze zdrowej tkanki. Okazało się, że ponad połowa genów kodujących RBP ma zmienioną ekspresję w guzie. Za szczególnie istotną uważam analizę korelacji ekspresji kolistych RNA, białek wiążących RNA oraz ich potencjalnych miejsc wiązania. Ten etap badań pozwolił Doktorantce wskazać kilkanaście białek RBP, które mogą mieć istotne znaczenie w biogenezie kolistych RNA w glejaku wielopostaciowym. W przyszłości informacje te mogą zostać wykorzystane do poznania molekularnego mechanizmu zaburzonej ekspresji kolistych RNA w glejaku wielopostaciowym. Na obecnym etapie badań Doktorantka w ciekawy sposób postanowiła wykorzystać uzyskane informacje i przeprowadziła analizę na podstawie której zasugerowała, że profil ekspresji RBP mógłby zostać wykorzystany do identyfikacji podtypów molekularnych glejaka, co w przyszłości mogłoby zostać wykorzystane do stosowania odpowiedniej, spersonalizowanej terapii.

Po stwierdzeniu zmienionego profilu ekspresji kolistych RNA w glejaku wielopostaciowym Doktorantka postanowiła przeprowadzić charakterystykę wybranych kolistych RNA. Jako obiekt swoich badań wybrała dwa RNA – circATXN10 oraz circFAM188A. Początkowo, wykorzystując trawienie RNA za pomocą RNazy R potwierdziła, że wybrany RNA faktycznie posiada kolistą formę. Aby przeprowadzić badania funkcjonalne Doktorantka sprawdziła ekspresję circATXN10 i circFAM188A w kilku ustalonych liniach komórkowych glejaka wielopostaciowego. Co ważne, Doktorantka wykonała analizy ekspresji badanego RNA również w sferach, tzn. wielokomórkowych strukturach, które prawdopodobnie lepiej odzwierciedlają warunki guza niż komórki ustalonej linii komórkowej hodowane w monowarstwie. Wykonana analiza lokalizacji wewnątrzkomórkowej circATXN10 i circFAM188A pozwoliła stwierdzić mgr Julii Latowskiej-Łysiak, że oba badane koliste RNA są zlokalizowane w cytoplazmie komórkowej. Na tej podstawie Doktorantka określiła procesy zachodzące w cytoplazmie, jako te, w których badany kolisty RNA mógłby być zaangażowany bezpośrednio. Po przeprowadzeniu serii eksperymentów optymalizacyjnych Doktorantka opracowała procedury badawcze, które umożliwiły obniżenie poziomu badanego RNA za pomocą siRNA lub jego nadekspresję po transfekcji komórek odpowiednim wektorem. W kolejnej serii eksperymentów stwierdziła: 1) zależność poziomu circATXN10 i mRNA ATXN10, 2) oddziaływanie między kolistą i liniową formą ATXN10, 3) potencjalną rolę białek z rodziny RPA i U2AF w regulacji poziomu formy liniowej i kolistej ATXN10, 4) znaczenie circATXN10 i mRNA ATXN10 w migracji komórek glejaka i ich zdolności do inwazji. W mojej ocenie szczególnie ważna jest obserwacja, że zmiana poziomu circATXN10 i mRNA ATXN10 wpływa na migrację i zdolność do inwazji komórek glejaka.

W przypadku circFAM188A Doktorantka postawiła hipotezę, że jego rola może polegać na oddziaływaniu z miRNA. Na podstawie analizy sekwencji wytypowała dwa miRNA – miR-576 i miR-1238, które mogłyby oddziaływać z circFAM188A. Zastosowanie immunoprecypitacji białka AGO2 wskazało, że miR-1238 może bezpośrednio wiązać się z circFAM188A. W kolejnych badaniach Doktorantka wykazała, że zmiana poziomu circFAM188A wpływa na poziom miR-1238. Co ciekawe, analiza składu pęcherzyków zewnątrzkomórkowych przeprowadzona przez Doktorantkę wykazała obecność w tych strukturach miR-1238. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów mgr Julia

Latowska-Łysiak zaproponowała mechanizm regulacji biodostępności miR-1238 przez circFAM188A. Biorąc pod uwagę proponowaną w literaturze rolę miR-1238 w rozwoju chemiooporności komórek glejaka wielopostaciowego badania przeprowadzone przez Doktorantkę należy uznać za istotne i warte kontynuacji.

W ostatnim etapie badań Doktorantka postanowiła zidentyfikować białka RBP, które mogłyby uczestniczyć w regulacji circATXN10 i circFAM188A. Na podstawie informacji dostępnych w publicznych bazach danych Doktorantka postawiła hipotezę, że białko FUS i EIF4A3 mogą uczestniczyć w biogenezie badanych kolistych RNA. Analiza poziomu transkryptów FUS i EIF4A3 wykazała ich znacząco podniesiony poziom w materiale pochodzącym z guza w porównaniu do próby kontrolnej (zdrowy mózg). W kolejnym etapie Doktorantka sprawdziła czy poziom circATXN10 i circFAM188A zależy od poziomu białka FUS. W tym celu zbadała poziom badanego kolistego RNA w komórkach, z obniżonym lub podniesionym poziomem białka FUS. Okazało się, że poziom obu kolistych RNA zależy od białka FUS, z tym, że w przypadku circATXN10 Doktorantka zaobserwowała, że również poziom jego odpowiednika liniowego (mRNA), zależy od białka FUS; takiej zależności nie stwierdziła w przypadku mRNA FAM188A. Uzyskane wyniki wskazują, że białko FUS ma znaczenie w regulacji poziomu badanych kolistych RNA. Dokładny mechanizm wymaga dalszych badań, niemniej badania przeprowadzone przez mgr Julię Latowską-Łysiak stanowią ważny etap w poznaniu biogenezy circATXN10 i circFAM188A.

Rozprawa doktorska została przygotowana w postaci monografii, w języku polskim, z zastosowaniem klasycznego podziału tekstu na: wstęp, materiały i metody, cel pracy, wyniki, dyskusję, podsumowanie oraz obszerny spis literatury. Wstęp został poprzedzony streszczeniem napisanym w języku polskim oraz angielskim. Praca została przygotowana bardzo dobrze. Przedstawione informacje zostały opisane w ciekawy i umiejętny sposób. Dostrzegam i doceniam wysiłek Autorki w przygotowaniu tekstu oraz rycin. W pracy zauważyłem tylko bardzo nieliczne błędy lub omyłki językowe/tekstowe. Sugeruję sprawdzenie zasad pisowni skrótowców od słowa „doktor” (strona 2 rozprawy). Myślę, że umieszczenie rozdziału „Cel pracy” tuż po „Wstępie” ułatwiłoby połączenie celu zaplanowanych prac z istniejącym stanem wiedzy.

Rozdział „Wstęp” stanowi bardzo dobre wprowadzenie do tematyki badań. Kandydatka przygotowując tę część rozprawy wykazała się bardzo dobrą znajomością literatury tematyki badań. W odpowiedni sposób został dobrany poziom szczegółowości przedstawianych informacji. Na stronie 42 Autorka napisała o ośmiu najważniejszych cechach komórek nowotworowych, ale wymieniła ich dziesięć.

Bardzo dobrze zorganizowany został rozdział „Materiały i metody”. Z dbałością Autorka opisała stosowane materiały i metody, w tym analizy bioinformatyczne, co niestety nie jest powszechne. Informacje zawarte w tym rozdziale umożliwiają analizę przeprowadzonych eksperymentów, a w przyszłości ich powtórzenie przez niezależnych badaczy. W przyszłych opracowaniach warto zwrócić uwagę aby jasno zdefiniować w jaki sposób usunięto rybosomalny RNA z próbek RNA przeznaczonych do analizy z użyciem NGS. W rozdziale 2.6 stwierdzono, że analizowano próbki z 24 guzów pierwotnych – sądzę, że poprawna liczba to 23; w rozdziale 2.12 skład roztworu do lizy jest niekompletny; rozdział 2.32 „w stężeniu 50 ng” – nieprawidłowa jednostka. Wymieniam te nieliczne pomyłki, aby Autorka miała ich świadomość podczas przygotowywania manuskryptów. Co ważne, zakres zastosowanych przez Doktorantkę metod badawczych jest szeroki, co wskazuje, że Kandydatka opanowała warsztat badawczy na wysokim poziomie.

W rozdziale „Wyniki” Autorka zaprezentowała wyniki przeprowadzonych badań. Uzyskane wyniki zostały opisane w klarowny i dobrze zorganizowany sposób. Tekst tego rozdziału został opatrzony

odpowiednimi rycinami i tabelami. Autorka przeprowadziła swoje prace stosując odpowiednie analizy kontrolne oraz statystyczne. Warty podkreślenia jest wysiłek Kandydatki aby zastosować możliwie najbardziej odpowiedni i dostępny model badawczy.

Doktorantka w dojrzały i ciekawy sposób interpretuje rezultaty swojej pracy naukowej w rozdziale „Dyskusja”. Wyniki uzyskane w ramach rozprawy są omawiane i analizowane na tle danych literaturowych. Czytając ten rozdział rozprawy można dostrzec swobodę z jaką Autorka przygotowuje opracowania naukowe i wykorzystuje dostępne dane literaturowe. Lektura tego rozdziału dostarcza kolejnych argumentów wskazujących na bardzo dobrą znajomość tematyki badań i umiejętność prowadzenia pracy naukowej przez mgr Julię Latowską-Łysiak. Co ważne, Autorka dostrzega i komentuje ograniczenia uzyskanych przez siebie wyników lub zastosowanych metod. Nie zmniejsza to jednak znaczenia przeprowadzonych w trakcie rozprawy prac badawczych, a raczej podkreśla dojrzałość i rzetelność naukową Autorki. Kandydatka w rozdziale „Dyskusja” stawia hipotezy o roli kolistego RNA circATXN10 i circFAM188A w rozwoju glejaka wielopostaciowego.

Główne wyniki uzyskane przez mgr Julię Latowską-Łysiak zostały opisane powyżej. W tym miejscu chciałbym poprosić Doktorantkę o komentarz do następujących zagadnień:

- Rozdział 2.6 – według publicznie dostępnych danych wskazana w tym rozdziale procedura (Illumina, 20020594) przygotowania bibliotek do NGS obejmuje selekcję RNA z użyciem złoża oligo-dT. Czy faktycznie RNA przed odwrotną transkrypcją był poddawany takiej selekcji? Jeśli tak, jaki to może mieć wpływ na uzyskane dane?
- Lokalizacja wewnątrzkomórkowa kolistych RNA – czy rozważano wykorzystanie techniki FISH (hybrydyzacji *in situ*) jako alternatywę do frakcjonowania komórek.
- Autorka kilkakrotnie w swojej rozprawie zwraca uwagę na znaczenie nowotworowych komórek macierzystych. W przypadku jednej z analiz wskazuje, że zwiększona liczba komórek macierzystych w komórkach U87-MG, może być przyczyną odmierności w uzyskanych wynikach. W podsumowaniu stwierdza, że badania wykonane w ramach rozprawy dowodzą ważnej roli kolistych RNA w rozwoju glejaka poprzez wpływ na funkcjonowanie komórek macierzystych. Na jakiej podstawie Autorka formułuje takie wnioski? Czy Autorka sprawdzała czy w badanych warunkach zmienia się liczba komórek macierzystych? Czy oznaczano zmiany w liczebności tej „subpopulacji”?
- W przypadku analizy poziomu circEGFR w guzach pierwotnych i wtórnych stwierdzono wzrost 15000-krotny. Tak duża zmiana jest zastanawiająca. Czy poziom circEGFR w guzie wtórnym jest tak wysoki czy poziom tego RNA w guzie pierwotnym jest tak niski – niewykrywalny?
- Czy czynniki o udokumentowanej roli w „backsplicingu” wykazują zmienioną ekspresję w glejaku wielopostaciowym? Czy ich ekspresja zależy od circATXN10 lub circFAM188A?

Doktorantka jest współautorką dwóch artykułów naukowych, w tym jednego artykułu przeglądowego, w którym jest równorzędnym pierwszym autorem. Osiągnięcia Doktorantki w upowszechnianiu wyników swoich badań oceniam jako dobre. Dorobek ten z pewnością zostanie rozszerzony o artykuły naukowe opisujące wyniki badań przedstawione w rozprawie (trzy manuskrypty przesłane do recenzji). Pragnę podkreślić, że w mojej ocenie fakt, że opisane w monografii wyniki badań nie zostały jeszcze opublikowane w artykułach naukowych nie ma wpływu na wysoką wartość merytoryczną rozprawy.

Podsumowując, rozprawę doktorską mgr Julii Latowskiej-Łysiak **oceniam pozytywnie**. Podkreślić należy wielowątkowość prowadzonych prac i bardzo dobre przygotowanie rozprawy doktorskiej. Szczególnie doceniam zakres badań przeprowadzonych przez Kandydatkę, umiejętność posługiwania się publicznie dostępnymi danymi oraz wysiłek, który Kandydatka włożyła aby zastosować odpowiedni

model badawczy. Praca mgr Julii Latowskiej-Łysiak stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w dyscyplinie oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

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 wprowadzające 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 56/2023/Internet z dnia 29 marca 2023 r.) i wnioskuje do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie mgr Julii Latowskiej-Łysiak do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Ze względu na wysoką wartość merytoryczną, swobodę w posługiwaniu się różnorodnymi metodami badawczymi, umiejętność krytycznej analizy danych oraz bardzo dobre przygotowanie rozprawy doktorskiej wnioskuje o wyróżnienie rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.

Roman Szczęsny