



prof. dr hab. Artur Jarmołowski
Uniwersytet im. A. Mickiewicza
Wydział Biologii
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Zakład Ekspresji Genów
tel.: +48 61 829 5959
e-mail: artjarmo@amu.edu.pl

Poznań, 21. 05. 2024

**Ocena pracy doktorskiej mgr Julii Latowskiej-Łysiak pt. „Charakterystyka
wybranych kolistych RNA w glejaku wielopostaciowym – biogeneza kolistych
RNA i ich potencjalne funkcje”**

Ocena formalna

Oceniana rozprawa doktorska powstała w Zakładzie Neuroonkologii Molekularnej w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, pod kierunkiem dr hab. Katarzyny Rolle. Celem podjętych badań było poznanie i opisanie kolistych cząsteczek RNA, które funkcjonalnie powiązane są z najbardziej agresywnym i śmiertelnym typem guza mózgu – glejakiem wielopostaciowym. Założono, że uzyskane dane posłużą do lepszego podziału glejaka na poszczególne podtypy, co może mieć duże znaczenie w diagnostyce glejaka, a w konsekwencji zapewnić lepszą skuteczność zastosowania określonego sposobu leczenia. Jednocześnie, w uwagi na brak terapii, która prowadziłaby do całkowitego wyleczenia pacjentów chorujących na glejaka wielopostaciowego, wyniki przeprowadzonych badań mogą posłużyć do zaproponowania nowych podejść terapeutycznych. Temat ocenianej rozprawy jest nowatorski, a zawarte w ocenianej pracy wyniki mają charakter oryginalny i nie budzą zastrzeżeń, jeśli chodzi o rzetelność ich uzyskania. Praca jest obszernym, liczącym 183 strony manuskrytem o standardowym podziale na podrozdziały, powszechnie stosowanym w



przypadku rozpraw doktorskich z biologii molekularnej. Jest napisana po polsku, ładnym, poprawnym językiem.

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca przygotowana przez mgr Julię Latowską-Łysiak spełnia formalnie wszystkie wymogi stawiane przed rozprawami doktorskimi.

Ocena merytoryczna

Oceniana praca rozpoczyna się od obszernego Wprowadzenia, w którym Doktorantka przedstawiła dostępne dane literaturowe, zaczynając od epidemiologii i obowiązujących klasyfikacji glejaka wielopostaciowego, a kończąc na charakterystyce kolistych cząsteczek RNA związanych z nowotworami, w tym również funkcjonalnie powiązanych z glejakiem wielopostaciowym. W rozdziale tym mgr Julia Latowska-Łysiak opisała dokładnie metody stosowane w diagnostyce glejaka, a także omówiła sposoby jego leczenia. Dowiadujemy się z tej części pracy, że stosowane obecnie terapie skierowane przeciwko glejakowi wielopostaciowemu są dość nieskuteczne, co jednoznacznie wskazuje na potrzebę poszukiwania innych podejść w leczeniu tego groźnego nowotworu centralnego układu nerwowego. Doktorantka skupiła się następnie na charakterystyce zmian molekularnych obserwowanych w glejaku oraz przedstawiła markery molekularne stosowane przy podziale tej choroby na poszczególne podtypy. Ciekawe były dla mnie przedstawione przez Doktorantkę informacje o strukturze guza, typach komórek wchodzących w jego skład oraz mikrośrodowiska składającego się z macierzy zewnątrzkomórkowej oraz pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Druga część przeglądu literaturowego przygotowanego przez mgr Julię Latowską-Łysiak została poświęcona cząsteczkom RNA o połączonych końcach 3' i 5', czyli tak zwanym cząsteczkom kolistym. Są one znane od dość dawna, ale dopiero ostatnio zaczynamy rozumieć nie tylko, jak powstają, ale przede wszystkim, jaką rolę pełnią w regulacji ekspresji genów. W opisie mechanizmów powstawania kolistych RNA Doktorantka wspomniała o kolistych RNA powstających z fragmentów pre-miRNA wyciętych w postaci lassa (ang. *lariat*). Nie do końca rozumiem zaproponowany mechanizm powstawania circRNA

z takich produktów splicingu. Czy wiązanie 2'-5' fosfodiesterowe, charakterystyczne dla intronu w postaci lassa, jest zamieniane na regularne 3'-5'? Jeśli tak to w jaki sposób? Czy usunięcie intronu z takich form, o czym mgr Julia Latowska-Łysiak pisze na stronie 34, katalizowane jest przez spliceosom? Jak to możliwe? Ciekawy, a mało poznany jest również proces usuwania kolistych cząsteczek RNA z komórki, czyli ich degradacja. Chociaż zaproponowano kilka szlaków degradacyjnych dla poszczególnych cząsteczek, nie ma obecnie mechanizmu powszechnej degradacji kolistych RNA, mechanizmu obejmującego wszystkie takie cząsteczki. Ważnym podrozdziałem części wstępnej rozprawy mgr Julii Latowskiej-Łysiak jest fragment opisujący funkcje kolistych cząsteczek RNA. Chyba najlepiej opisaną i udokumentowaną funkcją circRNA jest rola gąbki (ang. *sponge*) w stosunku do wybranych miRNA. Ekspresja takiej kolistej cząsteczki powoduje obniżenie poziomu aktywnych miRNA o sekwencji komplementarnej do sekwencji występujących w circRNA. Drugim, powszechnym sposobem działania kolistych cząsteczek jest ich interakcja z białkami wiążącymi RNA, co może powodować obniżenie lub wzrost ich aktywności. Istnieją też doniesienia naukowe pokazujące, że niektóre cząsteczki kolistych RNA wpływają na inicjację transkrypcji, a także regulują translację. Warto również podkreślić, że niektóre cząsteczki kolistych RNA mogą ulegać translacji, oczywiście korzystając z procesu niezależnej od kapu inicjacji biosyntezy białka. Rozdział Wprowadzenie kończy omówienie circRNA związanych z różnymi nowotworami, w tym najwięcej miejsca poświęcono cząsteczkom kolistych RNA, których poziom ulega zaburzeniu w glejaku wielopostaciowym. Opublikowane przez innych naukowców wyniki badań wykazały, że poziomy ekspresji niektórych circRNA korelują z różnymi cechami kliniczno-patologicznymi glejaka, w tym z wielkością guza, stopniem złośliwości i zaawansowania, a także prawdopodobieństwem nawrotu. Rozdział zatytułowany Wprowadzenie został napisany interesująco i, co więcej, doskonale wprowadza czytelnika w dalsze części przedstawionej do oceny pracy doktorskiej. Jest to wyczerpujące omówienie stanu wiedzy na temat glejaka wielopostaciowego, oparte na najnowszej literaturze



naukowej. Notabene, spis literatury zamieszczony w pracy doktorskiej przygotowanej przez mgr Julię Latowską-Łysiak jest naprawdę imponujący i liczy aż 348 pozycji.

Kolejny rozdział to Materiały i metody. Ta część rozprawy została napisana przez Doktorantkę bardzo starannie i jasno. Nie mam żadnych wątpliwości, że na podstawie zamieszczonych opisów można powtórzyć wykonane przez mgr Julię Latowską-Łysiak doświadczenia. Nie mam zastrzeżeń do tej części pracy.

W następnym rozdziale Autorka ocenianej rozprawy nakreśliła główne cele swojej pracy doktorskiej. Z tej części dysertacji dowiadujemy się, że głównym celem podjętych badań była charakterystyka kolistych cząsteczek RNA, których poziom zmienia się w glejaku wielopostaciowym. Magister Julia Latowska-Łysiak zaplanowała także badanie funkcji wybranych circRNA, a także eksperyment, których celem była identyfikacja białek wiążących się specyficznie do kolistych cząsteczek RNA. Cele w ocenianej rozprawie zostały sformułowane bardzo jasno, są ambitne, ale możliwe do osiągnięcia w trakcie pracy nad doktoratem.

Najobszerniejszą częścią ocenianej pracy jest oczywiście rozdział poświęcony uzyskanym wynikom. Badania rozpoczęto od poznania profilu ekspresji kolistych cząsteczek RNA w glejaku wielopostaciowym. W ocenianej pracy doktorskiej przeanalizowano w sumie 26 próbek (w tym 23 z guzów pierwotnych i 3 próbki, które pochodziły z guzów wtórnych). Warto podkreślić, że w literaturze nie ma informacji na temat ekspresji circRNA w nowotworach wtórnych. Poziom większości cząsteczek kolistych RNA był, w porównaniu do komórek zdrowych, niższy w guzach glejaka wielopostaciowego. To zjawisko, obserwowane również w przypadku innych nowotworów tłumaczy się najczęściej intensywnością podziałów komórek nowotworowych w porównaniu do zdrowych komórek. Dane uzyskane z wysokoprzepustowego sekwencjonowania zweryfikowano metodą qPCR, wybierając losowo kilka cząsteczek circRNA i szacując ich poziom przy wykorzystaniu odpowiednich, specyficznych starterów. Dla większości przypadków uzyskano wyniki potwierdzające rezultaty analizy wysokoprzepustowej. Porównanie circRNA z poziomem liniowego pre-

mRNA, który zawiera sekwencje występujące w odpowiednim kolistym RNA, pokazało, że w większości przypadku wartości te nie są ze sobą skorelowane, korelację zaobserwowano tylko w jednym przypadku, circATXN10. Ciekawym wynikiem była obserwacja, że w guzach wtórnych poziom niektórych kolistych RNA był wyższy niż w guzach pierwotnych. Przykładem takiego circRNA jest circEGFR. Niestety niewielka liczba przeanalizowanych guzów wtórnych uniemożliwia jednoznaczną odpowiedź, czy te zidentyfikowane koliste RNA mogłyby być markerami wtórnego charakteru badanego guza. Niemniej jednak, wyniki uzyskane przez Doktorantkę są obiecujące, a badania kolistych RNA w guzach wtórnych jak najbardziej uzasadnione i niezbędne w prawidłowej diagnostyce i przewidywaniu postępu choroby.

Ponieważ w artykułach naukowych opisano przypadki zależności biogenezy circRNA od określonych białek wiążących RNA (RBPs; ang. *RNA-binding protein*), mgr Julia Latowska-Łysiak przeanalizowała uzyskane dane transkryptomyczne pochodzące z różnych guzów pod kątem poziomu ekspresji białek wiążących się do RNA. Doktorantka wykazała, że znaczna część białek RBP ma zmieniony profil ekspresji w glejaku wielopostaciowym. Analiza korelacji poziomów ekspresji między circRNA i białkami wiążącymi RNA pokazała, że w wielu przypadkach zaobserwowano korelację między poziomem mRNA białek i niektórymi kolistymi cząsteczkami RNA. W pracy omówiono na przykład białka z rodziny ELAV, których mRNA występują w glejaku na obniżonym poziomie. Poziom ekspresji tych białek skorelowany był z niskim poziomem circRNA. Jak słusznie zauważyła Doktorantka, może wskazywać to na zaangażowanie białek ELAV w proces powstawania niektórych przynajmniej kolistych cząsteczek RNA. Magister Julia Latowska-Łysiak wykorzystała także dane dotyczące zmian ekspresji białek wiążących RNA w glejaku wielopostaciowym do nowej klasyfikacji tego nowotworu. Czy ten nowy podział okaże się bardziej przydatny? Na to pytanie nie możemy jeszcze odpowiedzieć, musielibyśmy przeanalizować dodatkowe dane kliniczne i wykonać dokładniejsze badania laboratoryjne.

Najambitniejsze zadanie badawcze ocenianej rozprawy doktorskiej dotyczyło poznania funkcji circRNA i mechanizmów łączących koliste cząsteczki z procesami nowotworzenia. Do

dokładniejszych badań wybrano dwie takie cząsteczki: circATXN10 i circFAM188A. W obu przypadkach poziom kolistej cząsteczki spadał w guzach glejaka wielopostaciowego. Uzyskane wyniki zostały także potwierdzone metodą qPCR. Eksperymentalnie udowodniono również, że końce 3' i 5' obu badanych cząsteczek są połączone ze sobą, czyli, że badane RNA są koliste, a także stwierdzono cytoplazmatyczną lokalizację obu badanych cząsteczek. Ciekawie przedstawiał się także stosunek formy kolistej do mRNA, z którego powstała – w materiale pochodzącym od osób zdrowych więcej było formy kolistej, a mniej formy liniowej, w przypadku glejaka przeciwnie - zaobserwowano więcej formy liniowej, a mniej kolistej. Szkoda, że w analizach tych nie zbadano wydajności splicingu mRNA ATXN10, co mogłoby rzucić światło na sposób regulacji biogenezy circATXN10. A może wykonano takie badania tylko ich nie zamieszczono w rozprawie? Magister Julia Latowska-Łysiak zastosowała także odpowiednie siRNA do obniżenia poziomu kolistej i liniowej cząsteczki ATXN10. Badania te pokazały jednoznacznie, że wyciszenie formy liniowej prowadzi do wzrostu formy kolistej, i odwrotnie, wyciszenie formy kolistej prowadzi do wzrostu poziomu formy liniowej. Warto podkreślić, że eksperymenty te wykonano nie tylko na liniach komórkowych, ale również z wykorzystaniem tak zwanych neurosfery, czyli trójwymiarowych struktur, które lepiej imitują budowę guza. Doktorantka zwiększyła także w komórkach poziom circATXN10 i zaobserwowała zmniejszenie poziomu mRNA ATXN10. Wykonano także eksperymenty typu *pull-down*, które wykazały, że obie formy, kolista i liniowa występują we wspólnym kompleksie, najprawdopodobniej dzięki specyficznym białkom wiążącym RNA. Podczas obrony prosiłbym Doktorantkę o wyjaśnienie, jaki mógłby być biologiczny sens takiej interakcji. Czy miałyby to prowadzić do regulacji translacji? A może ma to związek z degradacją? Doświadczenia typu *pull-down* umożliwiły także analizę białek wiążących się do liniowej i kolistej cząsteczki RNA ATXN10. Wyniki były, moim zdaniem zaskakujące. Po pierwsze, zidentyfikowano różne białka wiążące się do liniowej i cyrkularnej formy badanego RNA. Muszę jednak podkreślić, że uzyskane dane można traktować wyłącznie jako wyniki

wstępne, które wymagają eksperymentalnego potwierdzenia, zanim zbuduje się na nich teorie i zaproponuje mechanizmy molekularne wyjaśniające poczynione obserwacje.

Bardzo ciekawe wyniki uzyskano również badając wpływ poziomu liniowej i kolistej formy RNA ATXN10 na migrację komórek. Magister Julia Laniewska-Łysiak wykazała w dobrze zaprojektowanych eksperymentach, że wyciszenie formy liniowej RNA ATXN10 powoduje wzrost migracji komórek nowotworowych, natomiast obniżenie poziomu formy kolistej miało odwrotny wpływ na migrację i inwazyjność komórek guza. W eksperymencie tym należy jednak uwzględnić wcześniejszy wynik przedstawiony w ocenianej rozprawie, pokazujący, że obniżenie poziomu kolistego RNA ATXN10 zwiększa poziom form liniowej, czyli mRNA ataksyny 10. Możliwe zatem, że wpływ na migrację komórek nowotworowych ma jedynie poziom ataksyny 10. Warto również zauważyć inny wynik zamieszczony w rozprawie mgr Julii Latowskiej-Łysiak, wskazujący na brak wpływu obu form RNA ATXN10 na tempo proliferacji. Na podstawie wykonanych doświadczeń Doktorantka proponowała, że circATXN10 charakteryzuje się działaniem onkogennym. Nie do końca zgadzam się z takim wnioskiem. Prosiłbym o wypunktowanie w trakcie obrony, na podstawie jakich wyników sformułowano taki wniosek końcowy. Moim zdaniem, wykonane eksperymenty wskazują raczej na wpływ poziomu białka ATXN10 na migrację i inwazyjność komórek, a nie bezpośrednią rolę circATXN10.

Drugą kolistą cząsteczką RNA, którą bliżej scharakteryzowała Doktorantka był circFAM188A. W pracy przedstawiono przekonujące dowody świadczące o interakcji circFAM188A z mikroRNA 1238 (miR-1238), wykorzystując metodę *pull-down*, a także obecność obu tych cząsteczek w kompleksie z AGO2. Dalsze badania miały na celu wykazanie, jaki wpływ na poziom tego miRNA ma circFAM188A. Uzyskane wyniki pokazały, że obniżenie poziomu circFAM188A skutkowało obniżeniem poziomu miR-1238, a podwyższenie poziomu circFAM188A skutkowało wyższym poziomem miR-1238 w komórkach. Ponieważ badany miRNA związany jest z odpowiedzią komórek na niedobór tlenu (hipoksja), porównano poziom akumulacji miR-1238 i circFAM188A w warunkach standardowych i w stanie hipoksji.

Stwierdzono, że poziom miR-1238 w warunkach niedoboru tlenu zwiększa się, natomiast poziom circFAM188A maleje. Najbardziej interesujący jest jednak wynik badania poziomu miR-1238 i circFAM188A w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych, gdzie zaobserwowano wzrost obu tych RNA. Sugeruje to rolę circFAM188A w eksporcie miR-1238. Chociaż bardzo podoba mi przedstawiona w ocenianej rozprawie hipoteza łącząca miR-1238 i kolisty RNA FAM188A z akumulacją miR-1238 w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych, to wydaje mi się, że stwierdzenie takie wymaga dalszych eksperymentów, aby je móc w pełni zaakceptować. Podkreślam jednak, że sama koncepcja jest niezwykle atrakcyjna i może mieć znaczenie w poszukiwaniu zupełnie nowych podejść terapeutycznych.

W przedstawionej do oceny rozprawie pokazano również, że białko FUS powiązane jest z regulacją poziomu zarówno circATXN10, jak i circFAM188a. Mówiąc dokładniej, poziom obu tych kolistych cząsteczek jest proporcjonalny do poziomu ekspresji genu kodującego FUS. Ponieważ wiadomo, że FUS zaangażowany jest regulację ekspresji genów związanych z progresją nowotworu, można założyć, że ma to również związek z akumulacją kolistych cząsteczek RNA, jako produktów tak zwanego *backsplicingu*, czyli niepoprawnego procesu wycinania intronów przez spliceosom. Nie ulega jednak wątpliwości, że te interesujące obserwacje wymagają dalszych badań i analiz.

Wszystkie uzyskane wyniki zostały precyzyjnie w rozdziale zatytułowanym Dyskusja. Ta ważna część dysertacji została oparta na olbrzymiej liczbie artykułów naukowych (jak już wspomniałem wcześniej, pełna lista cytowanych w pracy mgr Julii Latowskiej-Łysiak artykułów liczy aż 348 pozycji). Zarówno dobór prac użytych do przygotowania rozdziału Dyskusja, jak i sposób wykorzystania zawartych w nich informacji nie budzi moich zastrzeżeń. Jak już wspomniałem, wiele zaprezentowanych danych ma charakter wyników wstępnych i wymaga dalszych badań. Doktorantka zdaje sobie z tego sprawę i podkreśla ten fakt po omówieniu wyników i przedstawieniu ich interpretacji. Pracę kończy rozdział Wnioski i perspektywy, który w skrótowy sposób (jedna strona), w punktach przedstawia uzyskane wyniki oraz ich znaczenie

w zrozumieniu podstaw molekularnych procesów odpowiedzialnych za powstanie glejaka wielopostaciowego.

Uwagi końcowe

Uwagi krytyczne i pytania dotyczące ocenianej rozprawy nie umniejszają w żadnej mierze mojej bardzo wysokiej oceny pracy doktorskiej mgr Julii Latowskiej-Łysiak. W przedstawionej mi do oceny dysertacji przedstawiono interesujące i oryginalne wyniki naukowe. Zostały one właściwie zinterpretowane i krytycznie skonfrontowane z danymi pochodzącymi z artykułów, które zostały wcześniej opublikowane przez innych autorów. Doktorantka przedstawiła także perspektywy dalszych interesujących badań, co najlepiej świadczy o wysokiej jakości uzyskanych i przedstawionych w pracy danych.

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 wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie mgr Julii Latowskiej-Łysiak do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora. Jednocześnie, z uwagi na wysoki poziom przedstawionych w pracy wyników, wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr Julii Latowskiej-Łysiak.



Signed by /
Podpisano przez:

Artur Michał
Jarmołowski

Date / Data:
2024-05-21 10:49

prof. dr hab. Artur Jarmołowski