

Dr hab. Zbigniew Warkocki, prof. ICHB PAN  
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN  
Zakład Metabolizmu RNA

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Michała Sekreckiego pt. „Zależność biogenezy cząsteczki miR-21 od dojrzewania jej prekursorów na poziomie alternatywnego splicingu oraz poliadenylacji”**

Praca doktorska mgr Michała Sekreckiego została wykonana w Zakładzie Ekspresji Genów Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Promotorem pracy jest prof. dr hab. Krzysztof Sobczak.

Przedmiot rozprawy

Przedmiotem rozprawy doktorskiej jest krótka cząsteczka RNA miR-21, należąca do klasy krótkich regulatorowych RNA zwanych mikro RNA lub, w skrócie, miRNA. Cząsteczki miRNA występują powszechnie w organizmach eukariotycznych, przy czym wiele z nich jest konserwowanych ewolucyjnie. Geny kodujące miRNA określane mianem *MIR* występują w genomie samodzielnie lub wewnątrz większych regionów genowych, przeważnie w tzw. intronach genów kodujących białka. Rolą miRNA w komórkach jest regulowanie ekspresji genów poprzez wpływanie na zdolność do produkcji białek na matrycy cząsteczek informacyjnego RNA (mRNA), a ostatecznie również na trwałość mRNA. Zakłada się, że miRNA specyficznie wpływają na ekspresję większości ludzkich genów, a ich prawidłowe podaż i funkcjonowanie są nieodłączne dla zdrowego rozwoju i funkcjonowania komórek i całego organizmu. Omawiana w rozprawie cząsteczka miR-21 jest jedną z lepiej poznanych miRNA. Wykazano, że reguluje stężenie kilku różnych mRNA oraz, że została zidentyfikowana jako tzw. oncomiR tj. miRNA, którego zwiększone stężenie obserwowane jest w szeregu nowotworów, w tym w m.in. w nowotworze piersi.

Proces powstawania miRNA jest wieloetapowy i obejmuje transkrypcję pierwotnego prekursora zwanego *pri-miRNA*, który następnie przechodzi 2 etapy stopniowego skracania przez endonukleazy. Pierwsze cięcie zachodzi przy udziale DROSHA prowadząc do powstania *pre-miRNA*, drugie cięcie, w przeważającej mierze, przeprowadza DICER produkując ok. 21 nukleotydowe miRNA. W omawianym w rozprawie przypadku, zanim jeszcze autor rozprawy rozpoczął badania nad miR-21, wiadomo było, że gen kodujący miR-21 zazębia się z innym genem, *VMPI*, kodującym białko. To zazębiecie sekwencji genowych sprawia, że proces produkcji miR-21 może być zależny od produkcji *VMPI*, a nawet, że niektóre miR-21 powstają z transkryptu *VMPI*. Transkrypcji towarzyszą dodatkowe procesy. W omawianym przypadku istotne są procesy składania mRNA (ang. *splicing*) oraz poliadenylacji, których zajście wymaga specjanych sekwencji w obrębie transkrybowanego RNA. Takie sekwencje określane odpowiednio mianem miejsc splicingowych lub sygnałami poliadenylacji (PAS) są specyficznie rozpoznawane i wiązane przez komórkową maszynę enzymatyczną. Istotne jest, że w rozważanym przypadku, i w wielu innych również, istnieje kilka miejsc splicingowych i PAS, które, w obrębie każdego z tych procesów osobno, mogą zostać rozpoznane w sposób zamienny z innymi, co prowadzi do powstawania różnych produktów RNA z matrycy tego samego genu. Wykorzystanie podczas składania mRNA alternatywnych miejsc



splicingowych określa się mianem alternatywnego splicingu, podobnie wykorzystanie alternatywnych PAS określa się mianem alternatywnej poliadenylacji. Ponieważ splicing i poliadenylacja mogą i zazwyczaj zachodzą jednocześnie to obecność w bliskim sąsiedztwie w RNA różnych miejsc splicingowych i PAS prowadzi do kinetycznej rywalizacji pomiędzy procesami, które je wykorzystują. Efektem jest zwiększenie puli transkryptów powstających z pojedynczych genów, ale też regulacja stężeń powstających RNA.

### Cele rozprawy, uzyskane wyniki i ich naukowe znaczenie

Autor wprowadził cel swojej pracy w typowej lokalizacji, poprzedzając opis materiałów i metod oraz wyniki i dyskusję. Celem pracy doktorskiej było zbadanie zależności pomiędzy procesami dojrzewania transkryptów *VMP1* oraz *pre-miR-21*, w tym alternatywnego składania i alternatywnej poliadenylacji. Autor następnie wyszczególnia 3 cele cząstkowe pracy w tym: (a) ocenę zależności pomiędzy transkrypcją *VMP1*, a biogenezą miR-21, (b) określenie znaczenia alternatywnego miejsca poliadenylacji w transkrypcie *VMP1*, a ilością dojrzałego miR-21, (c) zbadanie wpływu alternatywnego splicingu *pri-miR-21* na wybór alternatywnych miejsc poliadenylacji i tym samym wydajność biogenezy miR-21. Oceniając sposób zaprezentowania szczegółowych celów pracy chciałbym zwrócić uwagę na duże zazębianie się pomiędzy celami szczegółowymi (a) oraz (b).

W następnej części pracy autor opisuje materiały i metody wykorzystane do przeprowadzenia badań. Opisy metod są wystarczająco dokładne aby móc odtworzyć przeprowadzone eksperymenty jednak kolejność ich przedstawienia w pracy jest dla mnie niezrozumiała np. pierwsza opisana procedura dotyczy eksperymentu, opisanego pod koniec sekcji wyników. Autor nie ustrzegł się pewnych niedomówień np. w rozdziale 3.3.3. dotyczącym transfekcji komórek podano, że transfekcji używano 1-2µg DNA, co nie jest zbyt precyzyjne i dodatkowo nie podano ani jaką ilość komórek transfekowano, ani jaki był rozmiar naczynia hodowlanego. Metody opatrzone 2 rycinami i 5 tabelami pomagającymi w zrozumieniu zastosowanych procedur. Bardzo pomocne byłoby gdyby w opisie metod autor zaznaczył rycinę lub ryciny, dla których wyniki uzyskano stosując dane podejście. Ponadto można by dodać tabelę podsumowującą zastosowane odczynniki, ich producentów, numery referencyjne i numery partii (ang. *lot numbers*).

W wynikach autor rozpoczyna od syntetycznej analizy danych ekspresji różnych izoform *VMP1* dostępnych w bazie danych GTEx oraz ich wizualizacji za pomocą przeglądarki Genome browser. Następnie przechodzi do analizy poziomów ekspresji *VMP1* w 12 różnych tkankach na podstawie danych z bazy danych GTEx obrazując istotne różnice. Aby móc badać naturalnie krótkotrwałe *pri-miRNA*, autor waliduje zastosowanie RNAi w celu obniżenia ekspresji DROSHA w liniach komórkowych HeLa, MCF-7 i HSkM. Skuteczne obniżenie ekspresji DROSHA autor potwierdza wykazując zwiększone stężenie 4 różnych *pri-miRNA* zapewne stosując qRT-PCR. Dodatkowo, autor napisał, że obserwowany był spadek ilości dojrzałych miRNA jednak nie pokazał tych danych na rycinie. Wykorzystując ww. modele komórkowe autor podjął się zbadania występowania transkryptów kończących się poniżej proksymalnego miejsca poliadenylacji oraz zależności ich stężenia od DROSHA za pomocą multipleks PCR. W mojej ocenie zastosowaną metodą nie jest ilościowa. Ponieważ matrycą dla krótszego fragmentu były nie tylko *lncVMP1* ale również *pri-miR-21* wyniki dla każdego z amplikonów powinny zostać znormalizowane względem niezależnej od nich kontroli. Ponadto spodziewałbym się analogicznych wyników przy zastosowaniu w RT starterów *random hexamers* i oligo(dT), a rozbieżności w uzyskanych wynikach wskazują właśnie na słaby aspekt ilościowy zastosowanej metody.



Ponieważ *pri-miRNA* akumulują w jądrze autor zdecydował się wykonać frakcjonowanie komórki. Nie rozumiem jednak dlaczego eksperyment wykonano stosując fibroblasty (GM23963, których nie ujęto w Tabeli 3 w materiałach i metodach) zamiast ww. modeli. Rycina 18 nie jest wystarczająco szczegółowa. W mojej opinii powinny na niej być osobno przedstawione pomiary dla frakcji jądrowej i cytoplazmatycznej oraz ich porównanie, które to dane chciałbym zobaczyć. W opisie ryciny brak informacji jaką metodę zastosowano, a był to najprawdopodobniej qRT-PCR. Kolejny podrozdział poświęcony jest badaniu poziomu ekspresji *VMP1*, *pri-miR-21* oraz *miR-21* podczas proliferacji mioblastów. Autor wykazuje wzrost stężenia *miR-21* poprzedzony wzrostem stężenia *pri-miR-21* oraz wzrost ekspresji *VMP1* podczas różnicowania mioblastów. Ze względu na odmienny model badawczy wyniki bardzo ogólnie wpisują się w zarys pracy i nie znajdują bezpośredniej kontynuacji w dalszej części pracy. W odniesieniu do pracy Ribas i wsp., aby sprawdzić czy wzrost ekspresji *VMP1* zakończonego na dystalnym PAS może prowadzić do wzrostu stężenia *pri-miR-21* autor zbadał względne poziomy ekspresji *VMP1* i *pri-miR-21* w opisanych wcześniej modelach z wyciszeniem *DROSHA*. Wyniki tych analiz nie wykluczają powstawania *miR-21* z transkryptu „*VMP1-pri-miR-21*”, jednak skłaniają do założenia, że ma to podrzędne znaczenie w produkcji *miR-21*.

W kolejnym podrozdziale autor zbadał poziom ekspresji *VMP1*, *pri-miR-21* oraz dojrzałego *miR-21* w komórkach modelowych raka piersi, MCF-7, oraz w komórkach kontrolnych, MCF-12A. Badanie za pomocą qRT-PCR wykazało istotnie wyższy poziom wszystkich wymienionych transkryptów w komórkach nowotworowych potwierdzając wcześniejsze doniesienia literaturowe. Inną potencjalną możliwością źródła *pre-miR-21* mogłoby być jego powstawanie z fragmentu wytworzonego w wyniku endonukleolitycznego cięcia transkryptu *VMP1* przez maszynę CPSF. Aby zbadać czy zaburzenie poliadenylacji przez obniżenie stężenia endonukleazy zaangażowanej w ten proces (CPSF3) doprowadzi do zwiększenia stężenia *pri-miR21* autor obniżył stężenie tego białka za pomocą RNAi. Autor zaobserwował bardzo wyraźny efekt tej interwencji na stężenie RNA wychodzących poza miejsce poliadenylacji w *GAPDH*, ale nie zaobserwował analogicznych zmian dla *VMP1* i *pri-miR-21*. Inną obserwacją było znaczące obniżenie ilości kilku dojrzałych *miRNA*, w tym *miR-21*. Mam pytania odnośnie tej części. Czy poczynione obserwacje znajdują potwierdzenie w publikacjach? Czy wyciszenie *CPSF3* ma ogólny wpływ na poziom translacji białek w komórkach?

W dalszej części pracy autor zastosował konstrukty genetyczne w celu zbadania wpływu mutacji w proksymalnym PAS na powstawanie *miR-21*. Istotnie autor zauważa, że w kontekście endogennych prekursorów *pri/pre-miR-21* wykrycie cząsteczki egzogennej byłoby utrudnione. Dlatego autor słusznie wprowadza mutacje w sekwencji kodującej *miR-21* w celu odróżnienia od endogenu i waliduje metodę qRT-PCR użytą w tym celu na RNA pozyskanym z transfekowanych konstruktem mysich komórek NIH3T3. Opracowany model badawczy autor wykorzystuje w połączeniu z antysensownym oligonukleotydem (AON) w celu zablokowania proksymalnego miejsca poliadenylacji, względnie stosuje konstrukt z tym miejscem zmutowanym w celu wyłączenia jego funkcjonalności. Zarówno po zastosowaniu AON jak i konstrukt z mutacjami w PAS autor obserwuje zwiększoną produkcję *pri-miR-21*, *miR-21* oraz obniżoną ekspresję kilku znanych genów regulowanych przez *miR-21*.

Zdecydowanie najważniejsza i nowatorska część wyników dotyczy zależności na linii składania mRNA i alternatywnej poliadenylacji, a produkcją *miR-21*. Autor zaobserwował istotne zwiększenie retencji intronu 11 w warunkach eksperymentalnego zablokowania proksymalnego miejsca poliadenylacji. Chciałbym upewnić się co do użytej metody, zakładam, że był to qRT-PCR, oraz zastosowanych starterów? W opisie Ryciny 25 nie podano tych informacji. Uważam, że wyniki z Ryciny 26 B-D powinny zostać

potwierdzone inną metodą. Następnie, stosując AON i konstrukt genetyczny ze zmutowanym miejscem splicingowym 3' w intronie 11 *VMP1* autor wykazał, że wyeliminowanie tego miejsca splicingowego prowadzi do retencji intronu 11 *VMP1* i do zwiększonej produkcji miR-21, czemu towarzyszyło obniżenie ekspresji kilku znanych genów regulowanych przez miR-21. Myślę, że warto byłoby powtórzyć zaprezentowany w rozdziałach 4.3.1. do 4.3.3. ciąg eksperymentalny (z AON) w pozostałych wykorzystywanych w tej pracy liniach tj.: MCF-7, MCF-12A i HSkM.

Rozdział „dyskusja” jest dobrze napisany i nie mam do niego uwag.

#### Główne uwagi i zapytania odnośnie zawartości naukowej rozprawy

Biorąc pod uwagę powszechność występowania miR-21 u człowieka oraz znaczenie tego miRNA w procesach nowotworzenia z pewnością podjęta w pracy doktorskiej tematyka badawcza jest ciekawa i istotna z naukowego punktu widzenia. Podjęta tematyka była również szeroko badana przez wiele grup naukowych i klinicznych na świecie. Szerokie zainteresowanie tematyką, w tym specyficznie mechanizmami powstawania miR-21 niesie z sobą również pewne trudności, wśród których jest fakt, że mechanizmy powstawania miR-21 były już badane przez przynajmniej 4 zespoły badawcze, a wyniki tych prac zostały opublikowane i zacytowane jako materiały źródłowe w ocenianej rozprawie. W tym kontekście należy pogratulować autorowi rozprawy sukcesu w wykazaniu związku pomiędzy retencją intronu 11-go *VMP1*, a obniżeniem wydajności poliadenylacji w miejscu proksymalnym *VMP1*. W efekcie powstaje więcej transkryptu *pri-miR-21* przekładając się na zwiększenie ilości miR-21. To niewątpliwie ciekawe odkrycie potwierdza umiejętność autora w identyfikacji istotnych pytań badawczych i umiejętność eksperymentalnego sprawdzania hipotez. Większa część pracy poświęcona jest badaniom wpływu alternatywnej poliadenylacji na biogenezę miR-21. Część ta w dużej mierze pokrywa się koncepcyjnie z opublikowanymi pracami innych grup badawczych, potwierdzając poczynione wcześniej odkrycia oraz tylko w ograniczonym zakresie je rozbudowując. W opisanych w rozprawie badaniach autor wykorzystał kilka różnych linii komórkowych. Mogłoby być to sporym atutem pracy pozwalającym na generalizację lub wskazanie na specyficzność badanych procesów. Niestety, analogicznych eksperymentów nie wykonano w całym panelu dostępnych modeli. Raczej wykorzystano różne modele do przeprowadzenia różnych eksperymentów, w mojej opinii, zaburzając spójność serii eksperymentów.

Moje duże wątpliwości budzi użycie metody multipleks RT-PCR do ilościowej oceny zmian poziomów ekspresji różnych transkryptów obejmujących introny 10 i 11 oraz egzon 12 *VMP1* oraz *pri-miR-21*. Metoda multipleks RT-PCR ma walory jakościowe, lecz nie ma ilościowych. Może się zdarzyć, że niezależna metoda potwierdzi wynik multipleks RT-PCR, ale może też wykazać coś zupełnie innego.

- Jakie główne zalety oraz jakie wady w ocenie autora rozprawy miało zastosowanie metody multipleks RT-PCR? Czy autor rozprawy mógłby zaproponować przynajmniej 2 inne podejścia metodologiczne pozwalające na ocenę zmian ekspresji, a jeśli to możliwe również do oceny jakie transkrypty obejmujące ww. rejony powstają w różnych modelach komórkowych? Czy autor próbował innych podejść eksperymentalnych poza multipleks RT-PCR i qRT-PCR?



Autor nie potrafił stwierdzić czy *pre-miR-21* może powstawać z transkryptów *VMP1* poliadenylowanych w dystalnym PAS, co zostało zasugerowane przez J. Ribas i wsp., i obrane jako cel szczegółowy badań w tej rozprawie.

- Czy autor rozważał zastosowanie RNAi celem obniżenie ekspresji białka XRN2 i uzyskania modeli badawczych na wzór modeli z obniżoną ekspresją DROSHA? Czy autor mógłby rozważyć zasadność lub uzasadnić brak zasadności wykorzystania takiego modelu badawczego? Czy autor rozważał zbadanie powstawania *pre-miR-21* w sytuacji gdy zmutowane zostanie miejsce dystalne poliadenylacji *VMP1/pri-miR-21*?

#### Ocena pozostałych rozdziałów rozprawy oraz uwagi uzupełniające

Poza walorami naukowymi istotnym elementem rozprawy doktorskiej jest jej logiczna struktura, zastosowany w opisach język oraz staranność w przygotowaniu ilustracji. Przedłożona do oceny rozprawa ma typowy układ poczynając od wizualnie atrakcyjnej strony tytułowej, poprzez podziękowania, wykaz skrótów i spis treści, po nieodzowne w rozprawie doktorskiej rozdziały: streszczenie, wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, wnioski i dyskusję oraz spis zacytowanej w rozprawie literatury. Układ pracy jest logiczny co sprawia, że lektura tej rozprawy nie nastrocza trudności. Przedłożona do oceny rozprawa nie jest jednak wolna od wad. W mojej ocenie łatwo zauważalnym mankamentem rozprawy widocznym w każdym z poniżej omawianych rozdziałów są bardzo liczne błędy językowe. Ponadto notoryczne w całej rozprawie jest pozostawienie tzw. sierot i wdów, które należałoby przenieść do następnego wiersza za pomocą tzw. spacji nierozdzielającej. Uciążliwe są również podziały opisów rycin lub wręcz rozdział ryciny i jej opisu pomiędzy stronami. W mojej ocenie autorowi rozprawy kłopotów przysporzyły opisy rycin i tabel. Każda rycina i każda tabela powinna mieć swój numer, tytuł oraz opis. Opis powinien zwięźle podawać najważniejsze informacje pozwalające zrozumieć co przedstawiono na rycinie lub w tabeli, jednak w przypadku rycin prezentujących wyniki nie powinien zawierać interpretacji tych wyników. Interpretacja, powinna znaleźć się w głównym tekście „wyników”, zaś jej rozwinięcie w „dyskusji”. W dalszej części omówię pozostałe rozdziały pracy w według ich kolejności w rozprawie.

Wykaz skrótów jest przejrzysty i przygotowany w sposób staranny. Jedynym zastrzeżeniem jest, że w przypadku skrótów zawierających duże litery brak jest konsekwencji w użytkowaniu dużych i małych liter w ich rozwinięciach. Stosowaną zasadą jest, że duże litery w skrócie są również pisane z dużej litery w jego rozwinięciu. Powyższe uwagi dotyczą stosowania skrótów w całej rozprawie. Ponadto, rozwijanie skrótów z języka angielskiego i inne obcojęzyczne wtrącenia powinny być zaanonsowane określeniem języka i pisane kursywą np. ORF (ang. *Open Reading Frame*), co akurat autor konsekwentnie zastosował.

Kolejną częścią w rozprawie jest spis treści. Dużym atutem w wersji elektronicznej rozprawy jest obecność tzw. linków, które poprzez kliknięcie umożliwiają bezpośrednie przejście do odpowiednich (pod)rozdziałów w rozprawie. W spisie i we wprowadzeniu brakuje odnośnika numerycznego dla oddzielnego podrozdziału pt. „*Rola rybonukleoprotein (snRNP) w procesie splicingu pre-mRNA*”.

Streszczenie w obu wersjach tj. po polsku i po angielsku zostało napisane przystępnie, umożliwiając zrozumienie czego dotyczy rozprawa, jakie były jej cele, jakie wyniki otrzymano i jakie jest ich znaczenie. Autor zaznacza, że na czas pisania rozprawy dostępnych było niewiele informacji dotyczących roli alternatywnego splicingu i alternatywnej poliadenylacji w regulacji ekspresji genów *MIR* oraz

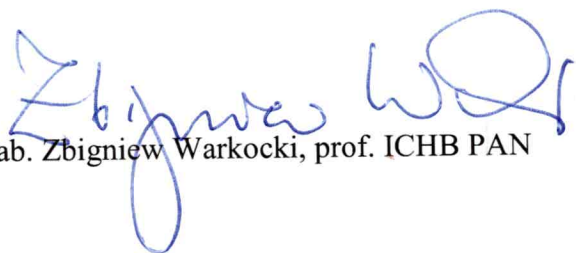
podsumowuje wyniki. Sugerowałbym konsekwencję w nazewnictwie alternatywnego splicingu, ponieważ w streszczeniu i tylko tam pojawia się również jako „wariantywny splicing”.

We wprowadzeniu autor słusznie rozpoczyna od informacji i założeń najbardziej ogólnych, przechodząc do tych bardziej szczegółowych. Wprowadzenie opatrzone jest 8 rycinami i 1 tabelą, które pozwalają lepiej zrozumieć omawiane zagadnienia. We wprowadzeniu zdecydowanie brakuje jednak opisów rycin. Pewien brak konsekwencji widoczny jest w nazewnictwie genów. Sugeruję stosować się do zasad nazewnictwa ujętych w wytycznych HGNC (<https://www.genenames.org/about/guidelines/>). Niejednokrotnie autor zacytował stosunkowo stare prace przeglądowe podając przynajmniej częściowo nieaktualne informacje np. na stronach 24 i 38. Między innymi autor napisał, że podczas procesu MZT (ang. *Maternal to Zygotic Transition*) „zaangażowanie cząsteczek miRNA (red. w *degradacji matczynej mRNA*) staje się dominujące”. To mocno zaakcentowane stwierdzenie jest wątpliwe w świetle najnowszych danych. Zacytowana publikacja jest przeglądowną z roku 2007. Należałoby odnieść się do nowszych danych literaturowych. Sumarycznie pomimo wymienionych niedociągnięć uważam, że wprowadzenie zostało przygotowane poprawnie.

Przedostatnim fragmentem rozprawy jest bibliografia, która zawiera 167 odnośników źródłowych. W spisie widoczne są błędy np.: błąd w roku publikacji i tytule w pozycji 28, w kolejności autorów w pozycji 46 oraz brak informacji o czasopiśmie, numerze i stronach w pozycji 105. Rozprawa zakończona jest spisem rycin i tabel, do którego nie mam uwag.

### **Podsumowanie recenzji**

Podjęta tematyka badawcza jest istotna i ciekawa z naukowego punktu widzenia. Przeprowadzone badania stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Sukcesem pracy eksperymentalnej, który uzasadnia moją końcową pozytywną ocenę było wykazanie związku pomiędzy składaniem mRNA, a alternatywną poliadenylacją i w efekcie produkcją miR-21. **Podsumowując pozytywnie oceniam pracę wykonaną przez mgr Michała Sekreckiego. Przedłożona rozprawa doktorska spełnia wymagania konieczne do uzyskania stopnia naukowego doktora. Zwracam się zatem do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu z wnioskiem o dopuszczenie mgr Michała Sekreckiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

  
Dr hab. Zbigniew Warkocki, prof. ICHB PAN

Poznań, 7. lutego 2021 r.