



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Dojazd 11
60-632 Poznań
tel. +48 61 848 72 02
e-mail: kbib@up.poznan.pl

WYDZIAŁ ROLNICTWA,
OGRODNICTWA
I BIONŻYNIERII
Katedra Biochemii i Biotechnologii

dr hab. n. med. Anna Woźniak
Kierownik Zespołu Diagnostyki Molekularnej
Katedra Biochemii i Biotechnologii
Uniwersytet Przyrodniczy
Ul. Dojazd 11
60-632 Poznań

Poznań, dnia 24.08.2022

Recenzja

**rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Grabowskiej
pt. „Wykorzystanie niekodujących RNA i nanotechnologii w regulacji ekspresji
wybranych białek macierzy zewnątrzkomórkowej glejaka i raka piersi”
wykonanej pod kierunkiem
Promotor: dr hab. Katarzyny Rolle, prof. IChB PAN
w Zakładzie Neuroonkologii Molekularnej
Instytutu Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu**

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Małgorzaty Grabowskiej przygotowana została na podstawie decyzji Rady Naukowej IChB PAN w Poznaniu (pismo z dnia 04.07.2022 w sprawie powołania mojej osoby na recenzenta w przewodzie doktorskim mgr Małgorzaty Grabowskiej, decyzja z dnia 08.06.2022 – podpisane przez Zastępcę Dyrektora ds. Naukowych IChB PAN dr hab. Luizę Handschuh).

Ocena doboru problematyki badawczej i tematu rozprawy

Praca doktorska Pani mgr Małgorzaty Grabowskiej dotyczy problematyki wykorzystania niekodujących RNA w połączeniu z produktami nanotechnologii w regulacji ekspresji białek macierzy zewnątrzkomórkowej (tenascyny-C i syndekanu-2) glejaka i raka piersi. Zgodnie ze statystykami Światowej Organizacji Zdrowia, choroby nowotworowe znajdują się na drugiej pozycji wśród przyczyn zgonów na świecie. Pomimo rozwoju technik diagnostycznych i chirurgicznych, niska skuteczność klasycznych terapii

przeciwnowotworowych niekorzystnie wpływa na rokowanie pacjenta. Zatem wyzwaniem medycyny XXI wieku jest opracowanie nowych strategii terapeutycznych, które przyczynią się do poprawy leczenia pacjentów onkologicznych.

Dynamiczny rozwój technik biologii komórkowej przyczynia się do poznania mechanizmów molekularnych i genetycznych a także do poznania cech mikrośrodowiska występujących w zmianach nowotworowych. Daje to możliwość wykorzystania nowej wiedzy w opracowywaniu skutecznych terapii chorób nowotworowych. Z uwagi na zdolność manipulowania na poziomie ekspresji genów, duże zainteresowanie dotyczy form terapii opartych o interferencję RNA (RNAi). Wybranie odpowiednich celów terapeutycznych kluczowych dla progresji nowotworu jest bezpośrednio związane z wyzwaniem dotyczącym dostarczania terapeutyku w docelowe miejsce. Odpowiedzią na to wyzwanie może stać się nanotechnologia. Z uwagi na unikatowe cechy nanocząstek (rozmiar, zdolność do przenikania przez błonę komórkową, możliwość modyfikacji chemicznej) znajdują one zastosowanie w biomedycynie jako nanonośniki leków, środków terapeutycznych, kontrastujących i innych biomolekuł. Trudno przecenić potencjał interferencji RNA w połączeniu z osiągnięciami nanotechnologii w aspekcie poprawy diagnostyki, leczenia i monitorowania chorób nowotworowych.

Uważam zatem, że tematyka przedstawiona w pracy doktorskiej jest niezwykle trafna i istotna a podjęcie próby rozwiązania problematyki regulacji ekspresji tenascyny-C w połączeniu z oceną udziału macierzy zewnątrzkomórkowej w procesie nowotworzenia w gnejaku i raku piersi jest wyzwaniem współczesnej biomedycyny i nawiązuje do aktualnej tematyki realizowanej przez wiodące ośrodki naukowe.

Ocena układu pracy

Rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Grabowskiej składa się z 221 stron wydruku komputerowego i obejmuje 9 rozdziałów: wykaz prac naukowych, streszczenie w języku polskim, streszczenie w języku angielskim, wykaz skrótów, cel pracy, wprowadzenie, omówienie prac naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, wnioski, bibliografia (223 aktualne pozycje literaturowe). Praca zawiera również załączniki w postaci: Oświadczeń kandydata o wkładzie własnym w prace naukowe wchodzące w skład rozprawy doktorskiej; Oświadczeń autorów korespondencyjnych o wkładzie kandydata w prace naukowe wchodzące w skład rozprawy doktorskiej oraz wydruki publikacji. Recenzowana praca została zredagowana poprawnie, a sporadyczne usterki językowe (literówki), nie wpływają na jej ocenę, zatem je pomijam.

W skład rozprawy doktorskiej wchodzi pięć publikacji naukowych:

1. Grabowska M*, Kuczyński K*, Piwecka M, Rabiasz A, Zemła J, Głodowicz P, Wawrzyniak D, Lekka M, Rolle K. ***miR-218 affects the ECM composition and cell biomechanical properties of glioblastoma cells.*** *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2022. 00:1-18. IF2022 = 5,31; pkt MEiN = 100
2. Grabowska M, Misiorek JO, Zarebska Ż, Rolle K. ***Applications of noncoding RNAs in brain cancer patients.*** *Clinical applications of noncoding RNAs in cancer.* Elsevier. 2022. 2:17-64. pkt MEiN = 80; liczba cytowań = 1
3. Grabowska M, Grześkowiak BF, Rolle K, Mrówczyński R. ***Magnetic Nanoparticles as a Carrier of dsRNA for Gene Therapy.*** *Methods in Molecular Biology.* Springer. 2021. 2211:69-81. pkt MEiN = 80; liczba cytowań = 1
4. Wawrzyniak D, Grabowska M, Głodowicz P, Kuczyński K, Kuczyńska B, Fedoruk - Wyszomirska A, Rolle K. ***Down-regulation of tenascin-C inhibits breast cancer cells development by cell growth, migration, and adhesion impairment.*** *PLoS One*. 2020. 15(8):e0237889. IF2020 = 3,24; pkt MEiN = 100; liczba cytowań = 8
5. Grabowska M, Grześkowiak BF, Szutkowski K, Wawrzyniak D, Głodowicz P, Barciszewski J, Jurga S, Rolle K, Mrówczyński R. ***Nano-mediated delivery of double-stranded RNA for gene therapy of glioblastoma multiforme.*** *PLoS One*. 2019. 14(3):e0213852. IF2019 = 2,74; pkt MEiN = 100; liczba cytowań = 23

Publikacja oznaczona numerem 1 jest pracą oryginalną opublikowaną w 2022 roku w czasopiśmie *Journal of Cellular and Molecular Medicine* (parametry bibliometryczne IF2022 = 5,31; pkt MEiN = 100). Publikacja oznaczona numerem 2 stanowi rozdział o charakterze przeglądowym opracowania książkowego z 2022 roku *Clinical applications of noncoding RNAs in cancer* wydawnictwa Elsevier (parametry bibliometryczne pkt MEiN = 80; liczba cytowań = 1). Publikacja oznaczona numerem 3 to rozdział cyklu wydawniczego Springer z 2021 roku *Methods in Molecular Biology*, stanowi opis metodyki badań będących podstawą publikacji „*Nano-mediated delivery of double-stranded RNA for gene therapy of glioblastoma multiforme*” (parametry bibliometryczne pkt MEiN = 80; liczba cytowań = 1). Publikacja oznaczona numerem 4 to praca oryginalna opublikowana w 2020 roku w czasopiśmie *PLoS One* (parametry bibliometryczne IF2020 = 3,24; pkt MEiN = 100). Publikacja numer 5 to również praca oryginalna opublikowana w 2019 roku w czasopiśmie *PLoS One* (parametry bibliometryczne IF2019 = 2,74; pkt MEiN = 100; liczba cytowań = 23).

Na uznanie zasługuje fakt, że mgr Małgorzata Grabowska jest pierwszym autorem w czterech na pięć prac (numery: 1, 2, 3, 5). Suma punktów (według listy czasopism MEiN) przedstawionych powyżej prac, zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 460, sumaryczny

Impact Factor – 11,29, a liczba cytowań 33. Doktorantka wykazała również publikację, która nie wchodzi w skład rozprawy doktorskiej. Dorobek publikacyjny Doktorantki oceniam wysoko.

Oświadczenie o wkładzie kandydata w prace naukowe wchodzące w skład rozprawy doktorskiej wyraźnie wskazuje na udział o charakterze wiodącym, począwszy od przeglądu literaturowego, poprzez wykonanie i analizę prac eksperymentalnych, a skończywszy na znacznym udziale w przygotowaniu manuskryptu. Oświadczenia autorów korespondencyjnych (prof. IChB Katarzyny Rolle oraz prof. UAM Radosława Mrówczyńskiego) potwierdzają zakres wkładu mgr Grabowskiej w powstanie poszczególnych prac.

Ocena merytoryczna

Już w pierwszej części rozprawy, Doktorantka sformułowała cele cyklu prac, tj. określenie udziału macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) w procesie nowotworzenia, a w szczególności: badanie wpływu niekodujących RNA na poziom kluczowych dla ECM białek: tenascyny-C i syndekanu-2 oraz związana z tym podejściem analiza zmian zachodzących w komórkach nowotworowych glejaka i raka piersi, ze szczególnym uwzględnieniem procesów migracji, adhezji i tworzenia przerzutów; poszukiwanie i badanie możliwości wykorzystania nowych narzędzi nanotechnologicznych dających możliwość dostarczania regulatorowych RNA do komórek; weryfikacja wykorzystania składników ECM w potencjalnej terapii nowotworów. Doktorantka następnie wykazała cele szczegółowe, które korespondują z problematyką prac eksperymentalnych wchodzących w skład cyklu.

W dalszej kolejności mgr Małgorzata Grabowska przedstawiła szerokie wprowadzenie do przedstawianych w pracach zagadnień. Autorka przedstawiła epidemiologię chorób nowotworowych, a w osobnych podrozdziałach scharakteryzowała diagnostykę, epidemiologię, typy i metody leczenia glejaka oraz raka piersi. Kolejny podrozdział wprowadzenia, Doktorantka poświęciła zagadnieniu macierzy zewnątrzkomórkowej, jej form strukturalnych, przebudowie, roli w homeostazie i kancerogenezie a także składowi, ze szczególnym uwzględnieniem multimerycznej glikoproteiny – tenascyny-C. Następnie, konsekwentnie do tytułu swojej pracy doktorskiej, mgr Grabowska opisała zagadnienia dotyczące niekodujących RNA (miRNA, siRNA, terapia RNAi), gdzie dokonuje skrupulatnej analizy ich użyteczności i trafnie uzasadnia wybór najkorzystniejszego narzędzia molekularnego do swych analiz. Ostatni podrozdział Doktorantka dedykowała opisowi zagadnień z zakresu nanotechnologii, nanonośników i ich wykorzystania przy dostarczaniu RNA do komórek, kończąc na przedstawieniu wykorzystania nanonośników w terapii glejaka. Wnikliwy opis wprowadzenia świadczy o dużej znajomości analizowanej przez Doktorantkę problematyki.

W dalszej części rozprawy, mgr Małgorzata Grabowska dokonała omówienia prac naukowych wchodzących w skład cyklu publikacyjnego. Jako pierwszą przedstawia pracę pt.: „*Applications of noncoding RNAs in brain cancer patients*”, w której dokonuje przeglądu wiedzy z zakresu wykorzystania niekodujących RNA (miRNA, lncRNA i circRNA) w nowotworach mózgu, głównie wysokozłośliwego glejaka oraz rdzeniaka zarodkowego. Druga praca pt.: „*MiR-218 affects the ECM composition and cell biomechanical properties of glioblastoma cells*” przedstawia wyniki prac eksperymentalnych z zakresu analizy poziomu ekspresji miR-218 oraz wybranych białek macierzy zewnątrzkomórkowej w tkankach oraz liniach komórkowych GB; określenia sposobu oddziaływania miR-218 na tenascynę-C oraz syndekan-2; oceny wpływu miR-218 na składniki ECM; analizy wpływu nadekspresji miR-218 na właściwości biomechaniczne komórek GBM. Uzyskane wyniki pozwoliły Autorce na konsekwentnie, w stosunku do wcześniejszych badań zespołu, prowadzoną selekcję miRNA i jego transkryptów (tenascyna-c i syndekan-2) i ocenę przebiegu zmian na poziomie komórki wywołanych nadekspresją miR-218. Znaczącą i unikatową wartość poszerzającą spodziewany efekt naukowy mają wyniki analiz funkcjonalnych wywołanych nadekspresją miR-218 w komórkach GBM i ich właściwości biofizycznych. W trzeciej publikacji pt. „*Nano-mediated delivery of double-stranded RNA for gene therapy of glioblastoma multiforme*” Doktorantka prezentuje wyniki prac oryginalnych dotyczących charakterystyki nanocząstek; cytotoksyczności nanocząstek i ich kompleksów z dsRNA, immunogenności ATN-RNA; porównania skuteczności terapii RNAi w komórkach GBM po zastosowaniu dsRNA na różnych nośnikach; analizy proliferacji i migracji komórek GBM po obniżeniu poziomu ekspresji TNC różnymi czynnikami transfekcyjnymi. Badania te powstały w wyniku współpracy z Centrum NanoBioMedycznym Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu w ramach projektu Narodowego Centrum Nauki, Opus 11 „Nowe, wielozadaniowe nanocząstki w skojarzonej geno- i fototerapii” (Kierownik prof. dr hab. Stefan Jurga). W pracy tej wykorzystano nanonośniki, co w oczywisty sposób czyni omawianą przez Doktorantkę tematykę, dziedziną interdyscyplinarną. Autorka w sposób jednoznaczny wykazała większą efektywność opracowanego nanokompleksu walidując uzyskane wyniki z produktem transfekcyjnym dostępnym komercyjnie (Lipofektamina). Ukoronowaniem sukcesu opisywanym badań było wykazanie wysokiej biokompatybilności i efektywności nanokompleksu MNP@PEI z ATN-RNA (niska cytotoksyczność, obniżenie poziomu ekspresji TNC i znaczący spadek tempa migracji komórek), co wskazuje na jego potencjał terapeutyczny. Czwarta publikacja pt.: „*Magnetic Nanoparticles as a Carrier of dsRNA for Gene Therapy*” stanowi rozdział cyklu wydawniczego *Springer Methods in Molecular Biology* i jest opisem metodyki badań będących podstawą opisywanej wyżej publikacji „*Nano-mediated delivery of double-stranded RNA for gene therapy of glioblastoma multiforme*”. Opublikowanie metodyki

swoich badań, przedstawienie gotowych protokołów wraz z notatkami jednoznacznie podkreśla, że zarówno materiały (doskonale uzasadniony wybór linii komórkowej do badań - U-118 MG), jak i metody (analiza toksyczności, analiza funkcjonalności, metody wprowadzania RNA do komórki, walidacja) są starannie wyselekcjonowane, z pewnością poparte intensywną pracą eksperymentalną w laboratorium. Na uwagę zasługuje fakt, że rzadko spotyka się Młodego Naukowca z takim warształem umiejętności metodologicznych. Piąta i ostanía publikacja pt. „*Down-regulation of tenascin-C inhibits breast cancer cells development by cell growth, migration, and adhesion impairment*” jest zbiorem badań, które wykazały skuteczność opracowanego nanokompleksu na liniach komórkowych innego niż glejak nowotworu – raka piersi. Autorka dokonała porównanie poziomu ekspresji TNC w różnych typach nowotworów; wyznaczyła korelację *in silico* pomiędzy TNC a progresją raka piersi; zastosowała ATN-RNA do obniżenia poziomu ekspresji TNC w komórkach raka piersi; zbadała wpływ obniżenia poziomu TNC na biologię komórek raka piersi (problematyka EMT); prowadziła obserwację formacji komórkowych struktur 3D po zastosowaniu ATN-RNA.

W rozdziale wnioski, Doktorantka trafnie sformułowała, że wyniki, które uzyskała pozwoliły na wykazanie, że tenascyna-c jest istotnym białkiem macierzy zewnątrzkomórkowej GBM i raka piersi, a obniżenie poziomu jej ekspresji wpływa na ruchliwość komórek, co ma istotny potencjalny wpływ na inwazyjność komórek nowotworowych. Obserwacja ta, a także zaprezentowane efekty zastosowania RNAi oraz wskazanie efektywnej metody dostarczania cząsteczki efektorowej do komórek dają podwaliny pod rozwój nowych terapii przeciwnowotworowych.

Za najważniejsze wyniki rozprawy doktorskiej uznaję:

1. Wykazanie, że miR-218 jest bezpośrednio zaangażowany w regulację ekspresji białek macierzy zewnątrzkomórkowej TNC i SDC2, co ma wpływ na proliferację, migrację, adhezję oraz właściwości biomechaniczne komórek linii komórkowej glejaka.
2. Wykazanie, że nanokompleks do RNAi (MNP@PEI z ATN-RNA) jest zdolny do obniżenia poziomu ekspresji docelowego białka TNC, co w konsekwencji prowadzi do obniżenia potencjału migracyjnego komórek nowotworowych glejaka.
3. Wykazanie uniwersalności zaproponowanego podejścia terapeutycznego dla nowotworów z nadekspresją TNC innych niż glejak, tj. dla raka piersi.

W podsumowaniu należy podkreślić spójność tematyczną cyklu prac przedstawionych przez Doktorantkę i konsekwencję, z którą prowadziła kolejne etapy badań. Sposób wykonywania analiz, umiejętność stawiania ostrożnych wniosków świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki. Dokładność w opracowywaniu harmonogramu badań i analiz wyników zyskuje się dzięki opiece naukowej doświadczonego w pracy eksperymentalnej promotora.

Uwagi krytyczne:

1. **Wykaz skrótów:** jest niekompletny, prowadzony niekonsekwentnie (str. 5: „czynników inicjujących translację 4A”; fibronektyna bez angielskiej nazwy, interferon β , interferon gamma).
2. **Cel pracy:** opisując tytuł projektu, w ramach którego realizuje się badania, zawsze warto wpisać dane Kierownika projektu.
3. **Wprowadzenie:**
 - str. 28 Autorka rozpoczyna zdanie: „Złote nanocząstki (...)”, aby na kolejnej stronie poprawnie napisać nanocząstki złota
 - zamieszczenie przez Autorkę podrozdziałów dedykowanych odpowiednio opisowi synekanu-2 oraz opisowi wykorzystania nanonośników w terapii raka piersi byłoby dopełnieniem idealnego wprowadzenia

Zagadnienia, wobec których proszę Doktorantkę o ustosunkowanie się:

1. Czy planuje Pani wykonanie badań regulacji ekspresji dla synekanu-2?
2. Wyniki Pani badań mają charakter aplikacyjny, proszę powiedzieć w jaki sposób wdrożyć je do praktyki?

Wniosek końcowy

W podsumowaniu, praca doktorska Pani mgr Małgorzaty Grabowskiej została napisana i zredagowana poprawnie, zgodnie z wymaganiami stawianymi tego typu opracowaniom. Praca stanowi spójny zestaw publikacji zebranych i podsumowanych w klarowny sposób. Warsztat badawczy, który opanowała Doktorantka zasługuje na wyróżnienie. Wskazane w recenzji uwagi krytyczne mają jedynie charakter sugestii. Pracę oceniam pozytywnie.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Małgorzaty Grabowskiej pt.: „Wykorzystanie niekodujących RNA i nanotechnologii w regulacji ekspresji wybranych białek macierzy zewnątrzkomórkowej glejaka i raka piersi” wykonanej pod kierunkiem promotor: dr hab. Katarzyny Rolle, prof. IChB PAN w Zakładzie Neuroonkologii Molekularnej Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228, z 2011 r. Nr 84, poz. 455). Zwracam się zatem do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Małgorzaty Grabowskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki

biologiczne.

W oparciu o wysoką ocenę rozprawy, współautorstwo w wielu publikacjach w wysokich rangą czasopismach naukowych, opublikowanie opracowanej metodyki w pozycji książkowej uznanego wydawnictwa oraz poszerzenie aktualnej wiedzy w ujęciu interdyscyplinarnym o znaczeniu aplikacyjnym - zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Anne Woźniak