

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Grabowskiej  
pt.: „Wykorzystanie niekodujących RNA  
i nanotechnologii w regulacji ekspresji  
wybranych białek macierzy zewnątrzkomórkowej  
glejaka i raka piersi”.**

**Promotor:  
dr hab. Katarzyna Rolle, prof. ICHB PAN**

Przedstawiona przez Panią mgr Małgorzatę Grabowską do recenzji praca doktorska została wykonana w Zakładzie Neuroonkologii Molekularnej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu i zawiera ważne aspekty badawcze pod kątem nie tylko samego podejścia badawczego ale także terapeutycznego, czy medycznego z wykorzystaniem wiedzy na temat regulacji ekspresji genów, w tym przypadku ekspresji białek w glejaku i raku piersi. Należy zatem podkreślić, że zachęcającym do dyskusji i recenzji atutem pracy jest omawiana w dysertacji problematyka i sposób podejścia do stawianych zagadnień badawczych.

Nowotwór piersi jest najczęściej diagnozowanym typem nowotworów wśród kobiet na całym świecie a główną przyczyną wysokiej śmiertelności pacjentów są przerzuty komórek nowotworowych. Kluczowym etapem w kaskadzie przerzutowania jest adhezja komórek nowotworowych do komórek śródbłonna oraz ich późniejsza transmigracja przez ścianę naczynia. Uważa się, że mechanizm adhezji i transmigracji komórek nowotworowych jest zbliżony do procesu wynaczynienia się leukocytów z krwioobiegu. Częsteczki adhezji komórkowej takie jak integryny są transbłonowymi białkami, które uczestniczą w interakcji komórka-komórka czy komórka-macierz zewnątrzkomórkowa.

Doktorantka w swojej dysertacji idzie w kierunku określenie udziału macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) w procesie nowotworzenia przedstawiając wpływ niekodujących RNA na poziom kluczowych dla ECM białek: tenascyny-C i syndekanu-2.

Ekspresja tenascyny-C zależy od fazy rozwoju organizmu i zmienia się znacząco w wielu różnych stanach patologicznych. W czasie embriogenezy tenascyna C jest obecna zwłaszcza w rozwijającym się ośrodkowym układzie nerwowym, w mezenchymie w miejscach przejścia mezenchymalno-epitelialnego, a także w rozwijających się tkankach łącznych. W dojrzałych tkankach ekspresja tenascyny C jest niższa, ale także obserwuje się jej indukcję podczas gojenia ran, regeneracji nerwów czy też w stanach patologicznych, w nowotworzeniu i przerzutowaniu. Zatem doktorantka w swoich badaniach starała się wyjaśnić rolę tenascyny C w rozwoju nowotworów polegającą na: 1) bezpośredniej stymulacji komórek nowotworowych do proliferacji i migracji, 2) promocji angiogenezy przez wpływ na komórki endotelialne. Tenascyna C bierze udział nie tylko w rozwoju guza pierwotnego, ale także uczestniczy w procesie przerzutowania i w ucieczce spod nadzoru immunologicznego. Jest przedstawiana jako niekorzystny czynnik rokowniczy, między innymi w nowotworach piersi, nerek, pęcherza moczowego, krtani i gardła dolnego oraz mózgu. Z kolei w raku szyjki macicy wysoka ekspresja koreluje z dobrą prognozą. Poza tym ekspresja tenascyny C może zostać wykorzystana do szacowania wznowy nowotworów

mózgu. Doktorantka przeanalizowała zmiany zachodzące w komórkach nowotworowych glejaka i raka piersi, ze szczególnym uwzględnieniem procesów migracji, adhezji i tworzenia przerzutów. Zaproponowała także zastosowanie nowych narzędzi nanotechnologicznych dających możliwość dostarczania regulatorowych RNA do komórek, ale także wstępnie przeprowadziła weryfikację możliwości wykorzystania ECM w potencjalnej terapii nowotworów.

Przedstawiona do oceny rozprawa posiada typowy układ i zawiera wszystkie wymagane części, napisana jest poprawnie pod względem formalno-językowym i stylistycznym. Praca liczy 72 strony, zawiera 10 podstawowych rozdziałów charakterystycznych dla pracy doktorskiej, 12 Rysunków, 1 Tabelę oraz 223 pozycje literatury. Składa się z Wykazu prac naukowych, Streszczenia w Języku polskim oraz Języku Angielskim, Wykazu skrótów, Celu pracy, Wprowadzenia, Omówieniu prac naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, Wniosków, Bibliografii i załączników. Każdy z rozdziałów zawiera konieczne elementy i jest odpowiednio skomponowany.

„Wprowadzenie” zostało prawidłowo skonstruowane. Doktorantka w sposób właściwy przedstawia zagadnienia dotyczące korelacji powstawania nowotworów. Praca zawiera oświadczenia o wkładzie doktorantki w przygotowanie prac naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, w których poświadcza swój znaczący udział w przygotowaniu publikacji obejmujących problematykę zawartą w dysertacji.

Dodatkowo, nienumerowane strony, zawierające oświadczenia doktorantki o wkładzie w prace naukowe wchodzące w skład rozprawy doktorskiej oraz strony z dołączonymi oświadczeniami autora korespondencyjnego o wkładzie doktorantki w prace naukowe zostały także dołączone do dysertacji.

Celem przedstawionej do recenzji pracy, zawierającej cykl prac naukowych, było 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; a także poszukiwanie i badanie możliwości wykorzystania nowych technik nanotechnologicznych dających możliwość dostarczania regulatorowych RNA do komórek z próbą podejścia w kierunku weryfikacji możliwości wykorzystania składników ECM w potencjalnej terapii nowotworów. Należy podkreślić, że główne cele stawiane przez doktorantkę zostały już opublikowane przez uznane, renomowane czasopisma, które już uwzględniły wartość merytoryczną i wykonawczą badań przeprowadzonych przez doktorantkę. W skład opublikowanych prac zaliczamy

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*. 00:1-18. W opublikowanej pracy doktorantka przyjęła określenie wpływu hsa-miR-218-5p na skład macierzy zewnątrzkomórkowej i właściwości biomechaniczne komórek glejaka. Oceniała poziom ekspresji miR-218, tenascyny-C i syndekanu-2 w tkankach pochodzących od pacjentów z guzami mózgu. Przeprowadziła także analizę właściwości

biomechanicznych komórek, takich jak adhezja, sztywność i migracja w wyniku regulacji poziomu ekspresji białek ECM poprzez miR-218.

2. Grabowska M, Misiorek JO, Zarębska Ż, Rolle K. Applications of noncoding RNAs in brain cancer patients. *Clinical applications of noncoding RNAs in cancer*. Elsevier. 2022. 2:17-64. Opublikowana praca omawia zastosowanie nanocząstek magnetycznych w potencjalnym podejściu terapeutycznym glejaka opartym na interferencji RNA skierowanej przeciw tenascynie-C. Celem prac było wyselekcjonowanie nanocząstek mających potencjał do spełnienia roli nośnika dwuniciowego RNA. Stosowane narzędzie interferencji RNA, zawierające w sobie nić komplementarną do mRNA TNC, tzw. ATN-RNA, zostało wykorzystane do wyciszenia ekspresji białka kluczowego dla budowy i funkcjonowania ECM. Dodatkowo zostały uzupełnione badania dotyczące zmian w proliferacji i migracji komórek nowotworowych. Doktorantka realizowała badania w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki Opus 11 „Nowe, wielozadaniowe nanocząstki w skojarzonej geno- i fototerapii” (2016/21/B/ST8/00477)

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. Tym razem badania dotyczyły wykorzystanie technologii RNAi oraz cząsteczkę ATN-RNA do hamowania procesu formowania się raka piersi, co pozwoliło na analizę możliwości zastosowania technologii w przypadku drugiego nowotworu, innego niż glejak. Zastosowane podejście terapeutyczne okazało się uniwersalne dla różnych nowotworów, co może sugerować „elastyczność” proponowanych technik. Zastosowanie ATN-RNA zostało scharakteryzowane pod kątem jego wpływu na procesy: proliferacji, migracji, cyklu komórkowego, tworzenia „miniguzów” oraz przebiegu przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego.

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. Doktorantka w opublikowanej pracy przeprowadziła także dokładną analizę bibliograficzną, gdzie w przygotowanej pracy przeglądowej opisała niekodujące RNA stanowiące klasę cząsteczek o kluczowym znaczeniu dla rozwoju i progresji nowotworów.

5. Grabowska M, Grześkowiak BF, Szutkowski K, Wawrzyniak D, Głodowicz P, Barciszewski J, Jurga S, Rolle K, Mrówczyński R. Nano-mediated delivery of doublestranded RNA for gene therapy of glioblastoma multiforme. *PLoS One*. 2019. 14(3):e0213852. W ostatniej dołączonej do dysertacji pracy, doktorantka wraz z współautorami opracowała protokół umożliwiający powtarzalne przeprowadzenie części z opublikowanych wcześniej eksperymentów dotyczących zastosowania nanocząstek MNP@PEI jako nośników RNA, mogących stanowić ulepszenie potencjalnej terapii glejaka.

W dołączonych 5 publikacjach, w których doktorantka jest współautorem a w 4 z nich jest pierwszym autorem, zostały szczegółowo opisane Materiały i Metody stosowane w przeprowadzonych badaniach. Prace były prowadzone na liniach komórkowych, ale także na tkankach pochodzących z materiału pooperacyjnego, a do realizacji tego zagadnienia zostały wydane konieczne pozwolenia ze strony Komisji Bioetycznej. Trzy z wymienionych

publikacji zostały wydane z IF, a wszystkie z wysoką punktacją MNNiSW, co dodatkowo dokumentuje znaczenie przeprowadzonych badań.

W przedstawionej dysertacji nie ma rozdziału Dyskusja, ale należy doszukiwać się tej części dysertacji w opublikowanych pracach. Należy podkreślić, że poprowadzona przez Doktorantkę część dotycząca wprowadzenia i omówienia prac naukowych, w oparciu o 223 pozycje literatury, świadczy o dojrzałej postawie naukowej, a wybrane pozycje literatury dobrze komponują z omawianymi wynikami i odnoszą się także do najnowszej literatury.

Doktorantka, mgr Małgorzata Grabowska wykazała się szeroka wiedzą i dojrzałością w zakresie prowadzenia badań, jak i analizowania uzyskanych wyników. Przedstawiona praca posiada nowatorskie podejście i bardzo praktyczny charakter. Doktorantka wykazała się umiejętnością zaplanowania eksperymentów badawczych i ich przeprowadzenia, wszystkie wyniki udokumentowała w sposób prawidłowy i przeprowadziła właściwą interpretację uzyskanych wyników. Praca jest przedstawiona w sposób spójny z bardzo dobrym, wyróżniającym się warsztatem laboratoryjnym.

Należy podkreślić, że najważniejsze wnioski wynikające z realizacji pracy doktorskiej to: 1. Wskazanie, że miR-218 jest bezpośrednio zaangażowany w regulację ekspresji białek macierzy zewnątrzkomórkowej TNC i SDC2, wpływając tym samym na proliferację, migrację, adhezję oraz właściwości biomechaniczne komórek linii komórkowej glejaka; 2. nanocząstki MNP@PEI są efektywnym i bezpiecznym nośnikiem wiążącym i wprowadzającym dsRNA do wnętrza komórek glejaka, skutecznie obniżając poziom ekspresji docelowego białka TNC i wpływając na obniżenie potencjału migracyjnego komórek; 3. dsRNA – ATN-RNA skutecznie obniża poziom ekspresji TNC w komórkach raka piersi, wpływając na ekspresję markerów przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego, obniżając proliferację i migrację komórek raka piersi oraz tworzenie „miniguzów” w warunkach in vitro.

Doktorantka, w podsumowaniu przeprowadzonych badań wskazuje, że TNC jest istotnym białkiem macierzy zewnątrzkomórkowej GBM i raka piersi. Obniżenie poziomu jej ekspresji wpływa na ruchliwość komórek, co ma istotny potencjalny wpływ na inwazyjność komórek nowotworowych. Dodatkowo efekty zastosowania RNAi oraz wskazanie efektywnej metody dostarczania cząsteczki efektorowej do komórek dają podstawy pod rozwój nowych terapii przeciwnowotworowych.

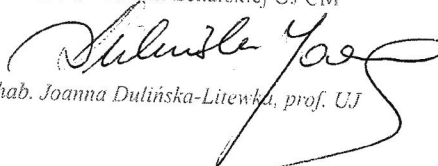
W przedstawionych wnioskach, brakuje mi informacji podsumowania roli SDC2 w ujęciu analogicznym jak w przypadku TNC. Nasuwa się także pytanie, dlaczego doktorantka wskazując do badania te konkretne białka celem omówienia/wyjaśnienia mechanizmów, oparła się na dwóch typach nowotworów podlegających różnym modelom regulacji w odniesieniu do procesu nowotworzenia.

Wymienione uwagi krytyczne, mają charakter porządkowy i/lub dyskusyjny i nie mają żadnego wpływu na bardzo wysoką wartość pracy co w żadnym stopniu nie umniejsza wartości merytorycznej dysertacji.

Podsumowując przedstawioną dysertację, stwierdzam, że praca mgr Małgorzaty Grabowskiej pt.: „Wykorzystanie niekodujących RNA i nanotechnologii w regulacji ekspresji wybranych białek macierzy zewnątrzkomórkowej glejaka i raka piersi” prezentuje bardzo dobry poziom naukowy i spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20.07.2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 poz. 85 z późn.zm), wnosząc do

Wysokiej Rady Naukowej INSTYTUTU CHEMII BIOORGANICZNEJ PAN w Poznaniu o dopuszczenie mgr. Małgorzaty Grabowskiej do dalszych etapów przewodu na stopień doktora nauk biologicznych oraz wnioskuje o WYRÓZNIENIE przedstawionej rozprawy doktorskiej.

Katedra Biochemii Lekarskiej UJ CM

  
dr hab. Joanna Dulińska-Litewka, prof. UJ