



Warszawa, 13.11.2023

## Recenzja rozprawy doktorskiej

**Doctorantka:** Żaneta Zarębska, M.Sc.

.....

**Tytuł rozprawy doktorskiej:** Identification and functional characteristics of circular RNAs in glioblastoma

.....

**Promotor:** Dr. Hab. Katarzyna Rolle, Prof. IBCH PAS

.....

**Recenzent:** Dr. hab. n. med. Agnieszka Bronisz, Prof. IMDiK, PAN

.....

## WARTOŚĆ NAUKOWA ROZPRAWY

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska przygotowana przez doktorantkę panią mgr Żanetę Zarębską wyróżnia się pozytywnie zaproponowanym modelem badań. Wyniki pracy przedstawionej w niniejszej rozprawie nie zostały opublikowane, ale temat został przedyskutowany w dwóch pracach przeglądowych. Charakterystyka kolistego transkryptomu w komórkach glejaka, tematyka podjęta przez doktorantkę, oferuje cenny wgląd w potencjalne znaczenie circRNA w rozwoju i progresji GBM.

Doktorantka podjęła się skatalogowania kolistego transkryptomu, wykorzystując technologię RNA-seq do analizy materiału biologicznego pobranego od pacjentów z diagnozą glejaka. Odpowiednio dobrane kontrole eksperymentalne oraz analiza danych pozwoliły na zaobserwowanie zmian komórkowych i molekularnych w odpowiedzi na modyfikacje ekspresji kolistych cząsteczek w komórkach glejaka. Wyniki te stanowią kolejny ważny dowód na to, że skład RNA komórkowego ma istotne znaczenie dla fenotypu komórkowego. Terapie przeciwnowotworowe oparte na RNA stanowią jeden z najszybciej rozwijających się trendów w medycynie translacyjnej. Praca doktorantki wpisuje się w ten trend, inspirując do ponownego spojrzenia na modele testów przedklinicznych.

Rozprawa doktorska Żanety Zarębskiej, zatytułowana "Identyfikacja i charakterystyka funkcjonalna kolistych RNA w glejaku," jest istotnym i oryginalnym wkładem w badania nad glejakiem (GBM). Kluczowym elementem rozprawy jest innowacyjny model asemloidalny *ex vivo*, który w sposób kompleksowy bada inwazję, rozwój choroby oraz odpowiedź terapeutyczną. Model ten opiera się na połączeniu ludzkich nienowotworowych organoidów mózgowych z organoidami pochodzącymi od pacjentów z glejakiem, co gwarantuje bardziej reprezentatywny

model choroby. Wykorzystanie w badaniach organoidów pochodzących od pacjentów podkreśla aspekt medycyny spersonalizowanej. Zrozumienie mechanizmów inwazji GBM ma kluczowe znaczenie dla opracowania lepszych strategii leczenia. Badanie circRNA zapewnia nowe spojrzenie na mechanizmy molekularne leżące u podstaw GBM, potencjalnie prowadząc do terapii celowanych. Należy podkreślić ograniczenia związane z liczbą dostępnych organoidów i próbek od pacjentów oraz konieczność omówienia możliwości replikacji modelu asembloidowego w innych środowiskach badawczych, co jest istotne dla szerszej społeczności naukowej."

### **WARTOŚĆ MERYTORYCZNA ROZPRAWY**

Mgr Żaneta Zarębska wniosła znaczący i oryginalny wkład w dziedzinę badań nad glejakiem, badając rolę kolistych RNA w tym wysoce agresywnym nowotworze mózgu. Rozprawa zatytułowana "The Identification and Functional Characteristics of Circular RNAs in Glioblastoma" jest dobrze skonstruowana i pouczająca, podkreślając znaczenie circRNA w rozwoju i progresji GBM.

Praca wyróżnia się kompleksowym skatalogowaniem transkryptomu kolistego próbek pochodzących od pacjentów i przy użyciu zaawansowanych technologii sekwencjonowania RNA. Podejście to wpisuje się w rozwijający się trend terapii opartej na RNA w medycynie translacyjnej, czyniąc ją istotną częścią tej dziedziny wiedzy.

Najbardziej godny uwagi wkład badań polega na opracowaniu złożonych modeli GBM, w szczególności na stworzeniu asembloidów. Asembloidy, łącząc ludzkie organoidy mózgowe z organoidami GBM pochodzącymi od pacjentów, zapewniają unikalny sposób badania inwazji guza zarówno we wczesnych, jak i późnych stadiach w zdrowej tkance mózgowej.

#### Kluczowe elementy przedstawione w dysertacji:

**Innowacyjny model inwazji GBM:** Badania wprowadzają nowatorskie podejście poprzez tworzenie asembloidów, oferując kompleksowy model do badania inwazji GBM. Połączenie ludzkich organoidów mózgowych z pochodzącymi od pacjentów organoidami GBM, zapewnia unikalny sposób badania inwazji guza.

**CircRNA w inwazji GBM:** Badanie to określa rolę circRNA w inwazji GBM, dodając unikalny wymiar poprzez badanie niekodujących RNA w kontekście inwazji GBM do zdrowej tkanki mózgowej.

**Organoidy pochodzące od pacjentów:** Zastosowanie organoidów glejaka pochodzących od pacjenta zapewnia bardziej reprezentatywny model choroby, odwzorowując heterogeniczność, wzór ekspresji genów i profil mutacji guza macierzystego. Zwiększa to znaczenie kliniczne badań.

#### Znaczenie:

**Znaczenie kliniczne:** Biorąc pod uwagę wyzwania w leczeniu GBM, badania nad mechanizmami inwazji są niezbędne do opracowania ulepszonych strategii

leczeniai może przyczynić się do opracowania skuteczniejszych terapii w przyszłości.

**Modele specyficzne dla pacjenta:** Wykorzystanie organoidów pochodzących od pacjentów podkreśla aspekt spersonalizowanej medycyny w badaniach. Badanie interakcji poszczególnych guzów ze zdrową tkanką mózgową może dostarczyć informacji na temat planów leczenia specyficznych dla danego pacjenta.

**Transkryptomika i circRNA:** Badanie circRNA i ich roli w inwazji GBM zapewnia nowy wgląd w mechanizmy molekularne leżące u podstaw tej agresywnej choroby, potencjalnie prowadząc do ukierunkowanych terapii skoncentrowanych na regulacji circRNA.

Potencjalne słabości:

**Szczegółowa metodologia:** Dysertacja mogłaby zyskać na bardziej szczegółowym opisie metod badawczych, zwłaszcza w sekcji wyników. Uwzględnienie informacji na temat technik, narzędzi i sprzętu zwiększyłoby powtarzalność wyników.

**Wielkość kohorty:** Ważne jest, aby odnieść się do ograniczeń pracy z ograniczoną liczbą organoidów lub próbek pochodzących od pacjentów. Należy również rozważyć stratyfikację płci w modelach zwierzęcych, istotną w modelowaniu odpowiedzi terapeutycznej *in vivo*.

**Możliwość powielania:** Omówienie możliwości powielania modelu asembloidalnego w innych środowiskach badawczych i laboratoriach jest niezbędne dla szerszej społeczności naukowej.

Podsumowując, badania te są bardzo obiecujące, jeśli chodzi o lepsze zrozumienie glejaka i jego agresywnego zachowania. Zajęcie się potencjalnymi słabościami, szczególnie w zakresie metodologii, struktury i integracji kontekstu, wzmocni wpływ i znaczenie rozprawy.

#### **OCENA ROZPRAWY:**

Rozprawa doktorska wprowadza dobrze ustrukturyzowane ramy do badania roli kolistych RNA (circRNA) w glejaku wielopostaciowym (GBM).

**Tytuł i streszczenie:** Tytuł skutecznie ujmuje temat badań, podczas gdy abstrakt oferuje solidny przegląd celów i kontekstu badań. Jednak większa zwięzłość abstraktu poprawiłaby jego czytelność.

**Spis treści:** Służy jako cenna mapa struktury rozprawy, ułatwiając czytelnikowi nawigację.

**Wprowadzenie:** Zapewnia kompleksowe podstawy do zrozumienia badań, co jest niezbędne, biorąc pod uwagę różne doświadczenia czytelników. Obszerne wprowadzenie oferuje istotny kontekst badania, obejmujący ogólną charakterystykę nowotworów, ośrodkowego układu nerwowego i glejaka. Zaleca się jednak większa zwięzłość we wstępie, aby utrzymać zaangażowanie czytelnika.

Wyraźne wyartykułowanie celów badawczych lepiej ukierunkowałoby oczekiwania czytelników.

**Cel badawczy:** Ta sekcja mogłaby zyskać na większej szczegółowości, w tym na oczekiwanych wynikach i wkładzie.

**Materiały i metody:** Sekcja metodologii jest szczegółowa i dobrze dopasowana do odpowiedzi na pytania badawcze. Jej mocne strony obejmują wykorzystanie modelu asembloidów opartego na organoidach, analizę sekwencjonowania następnej generacji (NGS) circRNA, analizę podtypów molekularnych i porównanie ze zdrową tkanką mózgową. Ta innowacyjna metodologia jest obiecująca do badania inwazji GBM i ekspresji circRNA.

Mocne strony metodologii:

Model asembloidów oparty na organoidach oferuje fizjologicznie istotne mikrośrodowisko do badania inwazji GBM, dokładniej odtwarzając interakcje między komórkami GBM a zdrową tkanką mózgową.

Analiza NGS krajobrazu circRNA pozwala na kompleksowe badanie wzorców ekspresji circRNA, przyczyniając się do głębszego zrozumienia ich roli w GBM.

Analiza podtypów molekularnych zapewnia wgląd w heterogeniczność GBM, potencjalnie identyfikując specyficzne dla podtypu circRNA o znaczeniu klinicznym.

Porównanie ekspresji circRNA w tkankach GBM z ekspresją w zdrowej tkance mózgowej ułatwia identyfikację deregulowanych circRNA specyficznych dla GBM.

Uwagi:

Stosunkowo niewielka liczebność próby w przypadku nawracającego GBM może ograniczać możliwość uogólnienia wyników związanych z nawracającymi przypadkami.

Konieczna jest optymalizacja modelu asembloidów do badań o wysokiej przepustowości poprzez uwzględnienie skali hodowli, warunków i wyboru próbek tkanek.

Włączenie komponentów układu odpornościowego i unaczynienia do modelu asembloidów jest niezbędne dla dokładniejszego odwzorowania złożonych interakcji i wzorców wzrostu GBM.

**Wyniki:** Sekcja wyników jest szczegółowa i dobrze zorganizowana, koncentrując się na analizie funkcjonalnej wybranych circRNA, profilowaniu circRNAome i generowaniu modelu *ex vivo* do modelowania przedklinicznego GBM. Wyniki zostały przedstawione w uporządkowany sposób, podkreślając cechy funkcjonalne circRNA circCLIP2 w GBM. Ta sekcja dostarcza dowodów na jego zaangażowanie w proliferację i inwazję komórek GBM. Ponadto identyfikuje circRNA z rozregulowanymi wzorcami ekspresji w pierwotnym i nawracającym GBM, co jest cenne dla tej dziedziny.

Rozdział "Knockdown transkryptów genu CLIP2": Ta sekcja powinna być przedstawiona w bardziej uporządkowany i przejrzysty sposób, zapewniając przegląd tego, dlaczego CLIP2 został wybrany jako cel knockdownu i jego potencjalną rolę w GBM. Potrzebna jest bardziej dogłębna interpretacja danych dotyczących skuteczności knockdown i omówienie implikacji obserwowanych różnic między liniami komórkowymi. Ponadto kluczowe znaczenie ma zajęcie się ograniczeniami i potencjalnymi źródłami zmienności w eksperymentach knockdown.

Rozdział poświęcony testom funkcjonalnym po usunięciu transkryptów genu CLIP2: Chociaż ta sekcja przedstawia jasne i zwarte dane na temat wpływu knockdownu circCLIP2 na proliferację, migrację i inwazję komórek, mogłaby skorzystać z bardziej dogłębnej interpretacji wyników i dyskusji na temat ich znaczenia w szerszym kontekście rozwoju i progresji GBM. Niezbędne jest zajęcie się potencjalnymi mechanizmami i powiązanie obserwowanych zmian w zachowaniu komórek z innymi znanymi cechami charakterystycznymi GBM.

Rozdziały dotyczące potencjalnej roli circCLIP2 w GSC i hipoksji: Rozdziały te dostarczają ekscytujących spostrzeżeń, ale mogłyby zyskać na bardziej dogłębnej dyskusji na temat potencjalnych mechanizmów stojących za tym, jak circCLIP2 może regulować GSC i niedotlenienie. Konieczne jest odniesienie się do implikacji tych odkryć dla rozwoju nowych terapii ukierunkowanych na GSC i niedotlenione mikrośrodowisko guza w GBM. Rozdziały powinny również uwzględnić ograniczenia badania, takie jak brak potwierdzenia wyników *in vivo*.

Rozdział poświęcony krajobrazowi circRNA w pierwotnym i nawracającym GBM: Rozdział ten dostarcza cennych spostrzeżeń, ale mógłby zyskać na pogłębionej dyskusji na temat potencjalnej roli funkcjonalnej różnie wyrażanych circRNA w rozwoju GBM, progresji i zachowaniach specyficznych dla podtypu. Porównanie tych wyników z istniejącą wiedzą na temat roli circRNA w GBM jest niezbędne, a zajęcie się ograniczeniami badania, takimi jak wielkość próby., ma kluczowe znaczenie.

Rozdział poświęcony rozwojowi asembloidów jako złożonego modelu do badania inwazji glejaka: Chociaż rozdział ten wprowadza nowatorskie podejście, mógłby on skorzystać na bardziej szczegółowych informacjach o generowaniu i charakterystyce asembloidów oraz dyskusji na temat potencjalnych zastosowań tego modelu poza badaniem inwazji glejaka. Istotne jest również zajęcie się ograniczeniami badania, takimi jak wstępny charakter danych. Podsumowując, chociaż sekcja wyników badania jest wyczerpująca i dobrze napisana, określone obszary w każdym rozdziale można poprawić w celu zwiększenia przejrzystości. Uwzględnienie sugerowanych ulepszeń wzmocniłoby przekaz uzyskanych wyników.

## **WNIOSKI KOŃCOWE**

Powyższe sugestie i uwagi krytyczne nie zmieniają mojej pozytywnej opinii o projekcie zrealizowanym przez doktorantkę. Praca ta stanowi oryginalny wkład do problemu naukowego, jakim jest pogłębienie wiedzy o kolistych cząsteczkach RNA

w modelu glejaka. Doktorantka połączyła wiedzę onkologiczną z technologią sekwencjonowania, a umiejętności te wykorzystywała w wyjaśnieniu roli kolistej formy tran skryptu *circCLIP2* w patogenezie komórek glejaka infiltrujących zdrową tkankę mózgu. Wyniki otrzymane przez Doktorantkę są cennym wkładem w modelowanie 3-wymiarowego mikrośrodowiska nowotworu *ex vivo*, dzięki której wiemy więcej o patofizjologii tej choroby nowotworowej.

Do istotnych zalet recenzowanej pracy należą:

- Aktualność, w tym pionierskie wprowadzenie modelu asemloidalnego, na poziomie odkrycia i badań przedklinicznych.
- Dogłębna analiza problemu badawczego i naukowego, poparta nowoczesnymi umiejętnościami metodologicznymi.
- Rzetelne i skrupulatne przedstawienie metodyki oraz dokumentacji procesu eksperymentalnego.

Reasumując, stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Żanety Zarębskiej pt. "Identyfikacja i charakterystyka funkcjonalna kolistych RNA w glejaku" przedstawia wartościowy wywód naukowy, a jakość przeprowadzonych przez Doktorantkę badań eksperymentalnych jest w skali polskiej pionierska i oryginalna. Zastosowanie wyników może mieć wpływ na naukę i wkład w rozwój nowych technologii monitorowania *ex vivo* mikrośrodowiska nowotworów. W mojej opinii przedstawiona praca jest ważna. Całość wyводу naukowego oraz jakość przeprowadzonych przez doktorantkę badań eksperymentalnych są wybitne.

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 Żanety Zarębskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Agnieszka Bronisz,

