



dr hab. Michał Szcześniak, prof. UAM  
Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu  
Wydział Biologii  
[miszczy@amu.edu.pl](mailto:miszczy@amu.edu.pl)

Poznań, 10 listopada 2023

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Żanety Zarębskiej pt.  
**„Identification and functional characteristics of circular RNAs  
in glioblastoma”**

## 1. Wprowadzenie

Rozprawa doktorska przedstawiona do recenzji została wykonana pod kierunkiem prof. IChB PAN dr hab. Katarzyny Rolke w Zakładzie Neuroonkologii Molekularnej Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Jest to praca z zakresu biologii molekularnej i dotyczy poszukiwań, jak również funkcjonalnej charakterystyki wybranej klasy niekodujących RNA, określanych mianem kolistych RNA w glejaku wielopostaciowym (łac. *glioblastoma multiforme*, GBM).

W pracy można wyróżnić następujące rozdziały:

1. *Introduction*, w którym podsumowano treść pracy doktorskiej oraz wyłożono podstawy teoretyczne badanych zagadnień, wliczając biologię glejaka oraz stan wiedzy na temat kolistych RNA,
2. *Research objective*, gdzie sformułowano trzy cele projektu doktorskiego,
3. *Materials and Methods*,
4. *Results*,
5. *Discussion*,
6. *Conclusions*.

Dodatkowo w pracy występują takie części, jak *Attachments*, *List of abbreviations*, *Funding* i *References*. Całość liczy 173 kolejno ponumerowane strony, z czego 41 przypada na spis literatury, obejmujący 650 pozycji. Poszczególne rozdziały są ze sobą spójne i tworzą logiczną całość. Nietypowe jest jednak to, że spis treści jest niejako w środku pracy (na stronie 10). Podsumowując, od strony formalnej, wliczając układ poszczególnych części i ich wzajemne proporcje, praca nie budzi zastrzeżeń.

Poniżej przedstawiono krótką charakterystykę wyników i wniosków przedstawionych przez autorkę.

## **2. Omówienie osiągnięć mgr Żanety Zarębskiej przedstawionych w rozprawie doktorskiej**

Doktorantka postawiła sobie następujące cele:

1. Zbadanie potencjalnych funkcji pełnionych przez circCLIP2, zwłaszcza w kontekście etiologii i rozwoju GBM.
2. Globalna charakterystyka circRNA w GBM, wliczając ich identyfikację oraz wybór kandydatów do dalszych testów.
3. Utworzenie modelu 3D, określanego mianem asembloidu, który powstaje w ko-kulturze dwóch organoidów: jednego powstałego ze zmienionej nowotworowo tkanki, a drugiego ze zdrowej tkanki mózgu.

Poszczególne trzy części rozdziału Results (tj. 4.1, 4.2, 4.3) korespondują z wyżej wyłożonymi celami i w związku z tym nie jest trudno ocenić stopień i zakres ich realizacji.

Autorce pracy udało się dość dobrze scharakteryzować badaną cząsteczkę circCLIP2. W szczególności wykazano, że (wybrane wyniki):

- Ma znacząco podwyższoną ekspresję w glejaku, w porównaniu ze zdrową tkanką mózgową
- Jego wyciszenie związane jest z obniżoną zdolnością komórek do podziału, jak również ich migracji i inwazyjności
- Poziom circCLIP2 jest podwyższony podczas przejścia epitelialno-mezenchymalnego (EMT)

Wyniki te dość mocno wskazują na udział badanego circRNA w rozwoju i przerzutowaniu GBM, jednak nie podjęto kroków, by zbadać mechanizm stojący u podstaw funkcji pełnionych przez circCLIP2 (np. pełnienie funkcji gąbki mikroRNA), co pozostawia dość dużą lukę w naszym rozumieniu biologii tej cząsteczki i utrudnia zastosowanie zdobytej wiedzy w pracy nad wykorzystaniem jej jako potencjalnego celu terapeutycznego. Niemniej jednak należy stwierdzić, że cel pierwszy zdecydowanie udało się osiągnąć.

W dalszej części pracy autorka omawia wyniki wielkoskalowej charakterystyki circRNA w glejaku, przeprowadzonej w oparciu o wysokoprzepustowe sekwencjonowanie transkryptomów (RNA-Seq) próbek od pacjentów z GBM oraz zdrowego mózgu człowieka. W sumie zidentyfikowano ok. 30 000 circRNA. Analiza ekspresji różnicowej wskazała deregulowane circRNA u pacjentów z pierwotnym glejakiem, z nawrotami choroby, jak również circRNA charakterystyczne dla poszczególnych podtypów GBM. Warto zauważyć, że część

circRNA występuje wyłącznie w próbkach od pacjentów cierpiących na GBM, stąd istnieje potencjał by wykorzystać tę wiedzę do opracowania skutecznych testów diagnostycznych. Ponadto, autorka potwierdziła eksperymentalnie istnienie wybranych nowych circRNA i wykonała walidację różnic w ekspresji obserwowanych w eksperymencie RNA-Seq za pomocą techniki RT-qPCR, co prowadzi do konkluzji, że zrealizowano drugi cel.

Ostatecznie, autorka opisuje opracowanie nowego trójwymiarowego modelu do badań nad GBM – są to organoidy opracowane na bazie zdrowych i zmienionych chorobowo tkanek mózgu, a w szczególności asembloid, będący efektem łączonej kultury obu takich organoidów. Jest to dość duże osiągnięcie samo w sobie. Jednak, jak sama autorka zauważa, zanim asembloid zostanie wykorzystany w dalszych badaniach, należy zoptymalizować pewne parametry modelu. Mimo pewnych niedociągnięć, również i ten cel uważam za osiągnięty.

Warto jeszcze zwrócić uwagę na następujące aspekty:

- Doktorantka wykonała samodzielnie znaczną część opisanych prac; doceniam, że w poszczególnych fragmentach pracy wyraźnie zaznaczono, że wybrane eksperymenty i obliczenia zostały wykonane przez inne osoby, np. w ramach współpracy międzynarodowej.
- Doktorantka jest autorką opracowań w powiązanej tematyce: są to cztery publikowane prace, z których w jednej jest pierwszą autorką, a także dwie prace, które aktualnie są w recenzji, a w których jest pierwszą autorką.

Ostatecznie, chciałbym żeby autorka rozprawy odpowiedziała na następujące pytania i uwagi podczas publicznej obrony:

1. Czy podjęto się próby zbadania funkcji pełnionych przez circCLIP2 na poziomie molekularnym; np. pełnienie roli gąbki miRNA, przynajmniej metodami bioinformatycznymi?
2. Sekwencjonowanie RNA w technice RNA-Seq obejmowało 26 pacjentów oraz cztery pulowane próbki mózgu człowieka od czterech różnych producentów. Czy uzasadnione jest wykorzystanie transkryptomów całych mózgów w analizie ekspresji różnicowej, jeśli choroba dotyka wybranych regionów anatomicznych? Czy wiadomo z jakich regionów mózgu pochodziły próbki od pacjentów, poza informacją o lewej lub prawej półkuli?
3. Strona 104: napisane jest „The RNA sequencing has been performed to establish circRNAs expression profiles in primary and recurrent GBM (primary GBM n=23 and recurrent GBM n=3, Table 11), compared to the healthy brain reference (n=41 HB samples, Table 11)”; Myślę, że nie powinniśmy tutaj mówić o 41 próbkach kontrolnych dla mózgu, ale o 4 spulowanych próbkach, które łącznie pochodzą od 41 osób – bo tak jest to traktowane podczas sekwencjonowania i dalszej obróbki danych. Ponadto, numeracja tabel jest tutaj błędna.



4. Czy próbowano wykonać analizę DE w kontekście płci? Czy badano różnice pod kątem wieku pacjentów?
5. Table 13: opisana tak samo jak Table 11 („GBM patient-derived tissues subjected to RNA sequencing”), ale zawiera inne dane i nie znalazłem odnośnika do tabeli w tekście (strony 70-73).
6. Dlaczego w analizach używano bardzo starej wersji genomu, GRCh37, zastąpionej nowszym (GRCh38) w grudniu 2013 roku?
7. Odczyty z danych RNA-Seq mapowano do genomu człowieka programem *bwa-mem*: czy nie powinno się wykorzystać narzędzia zdolnego do wykonywania tzw. mapowania ze splicingiem, np. HISAT2 lub STAR?
8. Analiza ekspresji różnicowej narzędziem edgeR: czy uwzględniono kryterium na istotność statystyczną, tj. False Discovery Rate (FDR)?
9. W podrozdziale 3.22 („Glioblastoma molecular subtype analysis and circRNAs clustering”) użyto transkryptomu człowieka z bazy Ensembl 102 – nie jest on kompatybilny z genomem w wersji GRCh37; nie napisano tutaj niczego na temat analizy podtypów nowotworu czy też klastrowania, czego można by się jednak spodziewać po tytule podrozdziału. W tym samym miejscu, Figure 23: czy podział na grupy „mesenchymal”, „classical”, „neural”, „proneural” był znany a priori? Jeśli tak, to na czym polegało klastrowanie? Czym są P01 itd. na ilustracji?
10. Na licznych wykresach przedstawiane są względne poziomy ekspresji circRNA – czy mogę prosić o jakieś statystyki dot. ich ekspresji, np. mierzone w TPM? Bezwzględne poziomy ekspresji są o tyle ważne, że mogą wskazać czy obserwowana zmiana ekspresji ma znaczenie biologiczne oraz czy nie wynika ze stochastyczności procesów biologicznych (np. 0.1 vs 0.2 TPM to coś innego niż 100 vs 200 TPM). Być może odpowiedź znajduje się na Fig. 3, ale nie podano tam jednostek ekspresji.
11. Sekwencjonowanie RNA-Seq asembloidu: czy nie należałoby wykonać osobnego sekwencjonowania dla obu komponentów strukturalnych asembloidu oraz miejsca kontaktu, zamiast całości? Czy tak uzyskane wyniki są interpretowalne biologicznie?
12. Czy circRNA są aktualnie wykorzystywane w medycynie jako markery prognostyczne lub diagnostyczne? Jeśli tak, proszę podać przykłady komercyjnych zastosowań. Czy prowadzone są badania kliniczne z ich wykorzystaniem i na jakim znajdują się one etapie?
13. Jakie kroki, zdaniem doktorantki, należy podjąć w następnej kolejności, aby uczynić asembloid jak najbardziej użytecznym modelem w badaniach nad GBM?
14. Pomocny byłby rysunek ilustrujący różne mechanizmy biogenezy circRNA w części wprowadzającej
15. Jeśli chodzi o technikę pisania, w pracy występują liczne uchybienia. Przede wszystkim często pojawiają się błędy gramatyczne, stylistyczne czy interpunkcyjne. Inne przykłady, to niepełne dane w tabeli (np. Table 18: Medium: „As stated in point X”), rysunek i jego opis na osobnych stronach czy błędne opisy ilustracji (np. podmienione opisy dla panelu A i B w Fig. 23).

### 3. Wnioski

Zgodnie z obowiązującymi przepisami, wliczając *art. 187 ust. 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce*, recenzja rozprawy doktorskiej powinna zawierać jednoznaczną odpowiedź na poniższe trzy pytania:

**1. Ocena wraz z uzasadnieniem, czy rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora w określonej dyscyplinie albo dyscyplinach**

Przedstawiona rozprawa doktorska w sposób jednoznaczny pokazuje wystarczającą wiedzę pani mgr Żanety Zarębskiej w zakresie biologii molekularnej od strony teoretycznej, jak również praktycznej (tj. techniki eksperymentalne), co wnioskuje na podstawie przedłożonych do oceny wyników, jak również wprowadzenia teoretycznego, stanowiącego wstęp do rozprawy.

**2. Ocena wraz z uzasadnieniem, czy rozprawa doktorska wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej lub artystycznej przez osobę ubiegającą się o nadanie stopnia doktora**

Autorka rozprawy doktorskiej odegrała kluczową rolę w wykonywanych badaniach, jak również interpretacji uzyskanych wyników. Jest to dodatkowo potwierdzone trzema publikacjami powiązаныmi tematycznie z niniejszą rozprawą, w których doktorantka jest pierwszą autorką.

**3. Ocena wraz z uzasadnieniem, czy rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, oryginalne rozwiązanie w zakresie zastosowania wyników własnych badań naukowych w sferze gospodarczej lub społecznej albo oryginalne dokonanie artystyczne.**

Uzyskane wyniki i ich walory merytoryczne, skrótkowo scharakteryzowane wyżej, pozwalają jednoznacznie stwierdzić, że rozprawa doktorska przedstawia oryginalne rozwiązanie problemu badawczego.

### 4. Podsumowanie

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska, w tym wyniki uzyskane przez doktorantkę, mogą być przedmiotem zainteresowania społeczności naukowej i stanowią wartościowy wkład do badań nad circRNA w nowotworach człowieka, mimo pewnych drobnych niedociągnięć czy też nieścisłości merytorycznych. Stwierdzam, że 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 wnioskuje do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie pani Żanety Zarębskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Michał Szczeniuk