

Poznań, 31.10.2023

Dr hab. Agnieszka Dzikiewicz-Krawczyk, prof. IGC PAN

Zakład Patologii Molekularnej

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Żanety Zarębskiej z tytułem  
„Identification and functional characteristics of circular RNAs in glioblastoma”**

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu pod kierunkiem dr hab. Katarzyny Rolke, prof. ICHB PAN. Rozprawa została przedstawiona w formie monografii i posiada klasyczny dla tej formy układ. Praca napisana jest w języku angielskim, liczy 173 strony, rozpoczyna się spisem publikacji i wykazem skrótów oraz streszczeniem w języku angielskim i polskim. Zgodnie z zawartymi w rozprawie informacjami, wyniki prezentowane w rozprawie są też ujęte w dwóch obecnie rozpatrywanych artykułach naukowych. W obu Doktorantka jest równorzędnym pierwszym autorem, co świadczy o jej istotnym wkładzie. Dodatkowo mgr Zarębska jest współautorką czterech opublikowanych prac przeglądowych dotyczących kolistych RNA, co wskazuje na jej sprecyzowane zainteresowania naukowe i doświadczenie w tej tematyce.

Tematyka badawcza rozprawy dotyczy roli kolistych RNA (circRNA) w glejaku wielopostaciowym i wpisuje się w nurt badań prowadzonych w Zakładzie Neuroonkologii Molekularnej ICHB PAN oraz trendy światowej nauki odkrywające coraz większą rolę niekodujących RNA, w tym circRNA, w prawidłowych oraz patologicznych procesach komórkowych. Głównym celem badań Doktorantki było kompleksowe zrozumienie roli kolistych RNA w rozwoju i inwazyjności glejaka wielopostaciowego. Jako cele szczegółowe wymienione zostały: 1) określenie funkcji wybranego na podstawie danych literaturowych circCLIP2; 2) globalna identyfikacja deregulowanych circRNA w glejaku; 3) opracowanie nowatorskich modeli 3D glejaka. Celom tym odpowiada struktura rozdziałów w części „Wyniki”. Biorąc pod uwagę wciąż mało poznane podłoże molekularne glejaka oraz niedoskonałe opcje terapeutyczne, ważne jest prowadzenie szeroko

zakrojonych badań podstawowych w celu poznania różnych aspektów biologii i patogenezы glejaka. W tym kontekście temat podjęty przez Panią mgr Zarębską jest bardzo istotny i na czasie.

W bardzo obszernym, liczącym 49 stron wstępie Doktorantka opisuje szczegółowo koliste RNA – ich biogenezę, funkcje, rolę w nowotworach ogólnie i w glejaku w szczególności – oraz jednostkę chorobową – obraz kliniczny glejaka wielopostaciowego, metody leczenia i cechy molekularne. Rozdział ten stanowi wyczerpujące wprowadzenie w tematykę pracy i świadczy o szerokiej wiedzy Doktorantki. Jednak w mojej opinii wstęp jest nawet zbyt obszerny i szczegółowy, zawiera rozdziały raczej zbędne (np. ogólna charakterystyka nowotworów) lub zbyt szeroko opisane (np. terapia glejaka – praca jest z dyscypliny nauk biologicznych, a nie medycznych). Zabrakło mi natomiast rycin, które pomogłyby usystematyzować i w przejrzysty sposób zaprezentować informacje niezbędne dla zrozumienia tematyki rozprawy (np. biogeneza i rodzaje circRNA oraz ich funkcje). Obszerność wstępu przekłada się też na długą listę cytowanej literatury (650 pozycji, z czego 578 w samym wstępie), w mojej opinii zdecydowanie zbyt długą. Wprawdzie badania niekodujących RNA bardzo rozwinęły się w ostatnim czasie i rzeczywiście większość cytowanych prac pochodzi z ostatniej dekady, jednak ważną umiejętnością naukowca jest też selekcja tych najistotniejszych i najważniejszych dla badanej tematyki. Tym niemniej, przedstawiony wstęp stanowi dobre wprowadzenie do tematyki rozprawy.

W rozdziale „Materiały i metody” opisany jest imponujący wachlarz technik biologii molekularnej zastosowanych w niniejszej pracy. Mimo trudno dostępnego materiału badawczego, jakim jest tkanka mózgu, Doktorantka zgromadziła kilkadziesiąt próbek od pacjentów z glejakiem. Stanowi to unikatową kolekcję i istotnie pozwala na szeroko zakrojoną analizę circRNA ulegających zróżnicowanej ekspresji, wybitnie podnosząc wartość pracy. Tutaj jednak nie jestem pewna co do konkretnych liczb. W Tabeli 11. scharakteryzowanych jest 26 pacjentów, od których pobrano materiał do RNA-seq. Następnie w rozdziale 3.6.2. wspomnianych jest 19 tkanek użytych do oceny ekspresji genu CLIP2, a poniżej w Tabeli 13. wymienionych 12 pacjentów – wg opisu pobrane od nich tkanki również poddano analizie RNA-seq. Prosiłabym Doktorantkę o wyjaśnienie tych nieścisłości. Być może też z powodu takiego nagromadzenia różnorodnych technik, umknęło Pani mgr Zarębskiej opisanie protokołu frakcjonowania komórek, który zastosowała przy ustalaniu lokalizacji komórkowej circCLIP2 (str. 89).

Przechodząc do wyników, w pierwszej części Doktorantka podjęła się określenia funkcji circCLIP2, wybranego na podstawie analizy danych literaturowych. Początkowo do badań wytypowane zostały jeszcze dwa inne koliste RNA, jednak wyniki ekspresji w tkankach pacjentów wykazały, że circCLIP2 ulega nadekspresji zarówno w pierwotnym glejaku, jak i po wznowie, a ponadto poziom ekspresji liniowego transkryptu jest dużo niższy niż kolistego, co ułatwiło dalsze analizy. Badając circCLIP2 Pani mgr Zarębska najpierw ustaliła, że znajduje się on głównie w

cytoplazmie. Następnie przeprowadziła szereg różnorodnych testów funkcjonalnych po wyciszeniu circCLIP2. Wyciszenie kolistych RNA nie jest trywialnym zadaniem, ponieważ region, w który można celować, aby specyficznym wyciszyć kolisty transkrypt bez wpływu na liniowy mRNA, jest ograniczony do miejsca tzw. back-splice junction. Doktorantka zastosowała siRNA nakierowane na kolisty oraz liniowy transkrypt, a wyniki uzyskane w dwóch liniach glejaka i wyprowadzonych z nich sferoidów potwierdziły wysoką wydajność wyciszenia docelowego transkryptu przy zerowym lub minimalnym efekcie na drugą izoformę. Stanowi to doskonały punkt wyjścia do dalszych analiz. Wyniki badań funkcjonalnych wykazały, że wyciszenie circCLIP2 – w przeciwieństwie do liniowego transkryptu – negatywnie wpłynęło na wzrost i migrację linii komórkowych glejaka oraz inwazyjność sferoidów. Chciałabym w tym miejscu zapytać Panią mgr Zarębską, jak interpretuje wyniki testu wound healing w kontekście tego, że wcześniej zaobserwowała wpływ wyciszenia badanego kolistego RNA na proliferację komórek. Czy można w takim wypadku jednoznacznie stwierdzić, że wyniki wound healing wskazują na zdolność komórek do migracji? Czy zastosowane zostały warunki eksperymentalne, które pozwalają rozróżnić te dwa procesy? Doktorantka zaobserwowała również wpływ wyciszenia circCLIP2 na przejście epitelialno-mezenchymalne komórek glejaka oraz na ekspresję markerów charakterystycznych dla macierzystych komórek nowotworowych. Całość wyników przedstawionych w tej części pracy wskazuje na ważną rolę circCLIP2 w komórkach glejaka. Co istotne, podobny efekt zaobserwowano w dwóch liniach komórkowych. Są to ważne i ciekawe wyniki. Ponieważ jednak zastosowano tylko jeden siRNA na transkrypt, biorąc pod uwagę możliwe niespecyficzne efekty siRNA, wnioski należy formułować z dużą ostrożnością.

Kolejnym celem rozprawy była globalna identyfikacja deregulowanych circRNA w glejaku. W tym celu Pani mgr Zarębska przeprowadziła RNA-seq na materiale pozyskanym od 23 pacjentów z pierwotnym glejakiem oraz trzech z jego nawrotową postacią, jako kontrolę stosując komercyjnie dostępny RNA ze zdrowej tkanki mózgu. Wyniki wskazały ponad 1200 circRNA deregulowanych w pierwotnym glejaku w odniesieniu do kontroli oraz trzy circRNA o podwyższonej ekspresji w nawrotowym glejaku w porównaniu do pierwotnego. Ciekawi mnie, ile ze zidentyfikowanych deregulowanych circRNA pokrywało się z tymi opisanymi przez Song i wsp., a w szczególności czy wśród znajdował się circCLIP2? Bardzo interesującym aspektem tej części pracy jest wg mnie wytypowanie pewnych circRNA charakterystycznych dla poszczególnych typów molekularnych glejaka. Jak Doktorantka ocenia w świetle tych wyników potencjał wykorzystania kolistych RNA w diagnostyce glejaka?

Trzecim celem pracy było opracowanie nowatorskich modeli 3D glejaka. Modele 2D oparte na liniach komórkowych, a nawet sferoidy wyprowadzone z linii glejaka, nie odzwierciedlają w pełni złożonego mikrośrodowiska guza, które odgrywa kluczową rolę w wielu procesach zachodzących w guzie. Stąd, aby możliwe było kompleksowe i jak najbardziej zbliżone do warunków *in vivo* badanie biologii glejaków, konieczne jest opracowanie modelu uwzględniającego te wzajemne zależności

między komórkami guza a mikrośrodowiskiem. Tego ambitnego zadania Doktorantka podjęła się w ramach stażu FEBS realizowanego w laboratorium dr Agnieszki Rybak-Wolf. Zastosowane podejście obejmowało wyprowadzenie organoidów z komórek glejaka pobranych od pacjentów, które następnie były hodowane razem z organoidami wytworzonymi ze zróżnicowanych w kierunku tkanki mózgowej komórek macierzystych (iPSC). Na dwóch otrzymanych w ten sposób asembloidach przeprowadzono barwienia immunofluorescencyjne dla markerów komórek glejaka i zdrowych komórek mózgu. Wykazano przenikanie się tych dwóch struktur, co może świadczyć o zachodzącym procesie inwazji komórek glejaka w zdrową tkankę. Jako osobie nieobeznanej z molekularnymi markerami zdrowej i nowotworowej tkanki mózgu było mi dość trudno wyłuskać znaczenie tych wyników. Z dyskusji wnioskuje jednak, że otrzymane asembloidy stanowią duży krok w stronę uzyskania kompleksowego modelu 3D glejaka, choć pewne aspekty wymagają dalszej optymalizacji.

Rozprawa jest przygotowana dość starannie, poprawną angielszczyzną, jednak znalazłam nieco braków lub błędów:

- Na Rycinie 4 błędnie opisane są osie Y – na wszystkich podany jest circCLIP2; mylące są też oznaczenia istotności, podane zarówno bezpośrednio nad słupkami oraz nad liniami łączącymi słupki (a czasem jest linia, ale brak oznaczenia istotności).
- W opisie wielu rycin podane jest, że pokazane są wartości średnie +/- odchylenie standardowe – ale nigdzie nie jest wspomniana liczba prób oraz czy były to powtórzenia biologiczne czy techniczne. Bardzo proszę Doktorantkę o sprecyzowanie w ilu niezależnych powtórzeniach biologicznych i replikatach technicznych były przeprowadzane prezentowane w pracy eksperymenty.
- Na Rycinie 14 moim zdaniem lepiej byłoby zastosować jednolity układ wszystkich wykresów, czyli albo wg dawki, albo czasu.
- Zauważyłam nieścisłość pomiędzy wynikami przedstawionymi na Rycinie 17 a opisem w tekście. Mianowicie w tekście napisane jest, że po wyciszeniu liniowego CLIP2 zaobserwowano obniżoną ekspresję Sox2 i Nanog w obu liniach. Podczas gdy wykresy na Rycinie 17 pokazują obniżoną ekspresję jedynie dla Sox2 w linii U138-MG, a w drugiej linii nie było zmiany. Ekspresja Nanog w obu liniach była podwyższona według tego, co widnieje na wykresach.
- Podobna nieścisłość występuje w przypadku Ryciny 19: circRNA PLOD2 i VCAN opisane są jako ulegające podwyższonej ekspresji w glejaku, podczas gdy wykresy wskazują na ich niższy poziom w glejaku w porównaniu do zdrowej tkanki mózgu.
- Na Rycinie 23 zamieniony jest opis paneli A i B.
- Rozprawa przygotowana jest w języku angielskim, zatem części dziesiętne powinny być oddzielane kropką, a nie przecinkiem (Tabele 28 i 29).

- Niewłaściwe użycie słowa „despite” (pomimo), np. na str. 14, 60, 110. Zdania nie brzmią logicznie.
- W Tabeli 14. i 16. wspomniane jest „medium as stated in point Y/X”? Czy tu miał być odnośnik do konkretnego podrozdziału rozprawy?
- Str. 82 – zamiast „response was carried out” powinno być „reaction was carried out”.

Podsumowując, Pani mgr Żaneta Zarębska w rozprawie doktorskiej dokonała wielowątkowej analizy kolistych RNA w glejaku wielopostaciowym. Cele rozprawy zostały osiągnięte i dostarczyły istotnych, oryginalnych wyników. Dzięki starannie dobranej i licznej grupie badawczej i globalnemu podejściu, udało się zidentyfikować circRNA specyficzne dla poszczególnych typów molekularnych glejaka, co może mieć znaczenie w kontekście diagnostycznym. Przykład circCLIP2, szczegółowo przebadanego przez Doktorantkę, pokazuje istotną funkcjonalną rolę, którą te cząsteczki mogą pełnić w chorobie. Wysoko też oceniam ambitny cel opracowania nowatorskiego modelu 3D glejaka uwzględniającego mikrośrodowisko guza, który pozwoliłby na badanie wielu aspektów niemożliwych do uchwycenia w hodowli 2D.

Stwierdzam zatem, że rozprawa Pani mgr Żanety Zarębskiej zatytułowana „Identification and functional characteristics of circular RNAs in glioblastoma” stanowi istotne poszerzenie wiedzy na temat kolistych RNA w glejaku. 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 99/2022/Internet z dnia 9 czerwca 2022 r.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie mgr Żanety Zarębskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Agnieszka Dzikiewicz-Krawczyk