

ul. Strzeszyńska 32
60-479 Poznań

tel. +48/61/657 91 00
fax +48/61/823 32 35
e-mail: igcz@man.poznan.pl

www.igcz.poznan.pl

Prof. dr hab. Maciej Giefing
Dyrektor Instytutu Genetyki Człowieka PAN
Kierownik Zakładu Genetyki Nowotworów

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Adriany Grabowskiej

pt. „Identyfikacja i charakterystyka regulatorowych RNA (sdRNA oraz snoRNA) w glejaku wielopostaciowym – ich udział w rozwoju i progresji nowotworu”

Celem przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej jest identyfikacja i charakterystyka nowej klasy regulatorowych RNA – sdRNA wraz z ich prekursorowymi snoRNA w rozwoju i progresji glejaka wielopostaciowego. Tym samym doktorantka podjęła się tematu znaczącego z klinicznego punktu widzenia ponieważ nowotwór ten należy do guzów bardzo agresywnych z najgorszym rokowaniem, gdzie mediana przeżycia od momentu diagnozy wynosi zaledwie 15 miesięcy. Równocześnie jest to nowotwór o jeszcze ciągle słabo poznanej patogenezie na poziomie molekularnym co daje nadzieję na przełomowe odkrycia wyjaśniające powstawanie, rozwój i oporność na leczenie tych nowotworów a następnie poprawę rokowań dla pacjentów. Stąd wybór tematyki rozprawy jest niewątpliwie trafny co jest zasługą samej doktorantki jak i Pani promotor. Podjęcie tego tematu jest zarazem decyzją ambitną gdyż badania nowotworów mózgu są utrudnione w skutek trudnego dostępu do materiału biologicznego, w tym z oczywistych przyczyn materiału kontrolnego a także utrudnionych badań na zwierzętach ze względu na występowanie bariery krew-mózg. Dodatkowo, doktorantka obrała za cel badanie sdRNA i snoRNA, które same w sobie stanowią przedmiot trudny i posługując się kolokwializmem „niewdzięczny”. Jest to spowodowane ciągle jeszcze mglistym i

niepełnym poznaniem prawdziwego znaczenia tych cząsteczek w biologii komórki jak również ich biogenezy. Sądzę, że recenzowana rozprawa doktorska jest dobrym potwierdzeniem moich słów, gdyż dostarcza ona tyle samo pytań co odpowiedzi a może nawet więcej tych pierwszych.

Chciałbym podkreślić, że recenzowana rozprawa bardzo dobrze wpisuje się w nurt badań prowadzonych w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN. Instytut jest uznaną jednostką w skali międzynarodowej jeśli chodzi o badanie cząsteczek RNA, zarówno w komórkach roślinnych jak i zwierzęcych.

Doktorantka postawiła sobie za cel nie tylko określenie roli nowych cząsteczek RNA w rozwoju glejaka ale również postanowiła ocenić ich potencjał diagnostyczny, prognostyczny a także mechanizm powstawania tej grupy RNA oraz ich funkcji. Moim zdaniem cele te są zbyt szeroko zakrojone jak na zakres rozprawy doktorskiej co niejako z założenia skazało doktorantkę przynajmniej na częściową porażkę i dało możliwość, w wielu przypadkach, jedynie powierzchownego potraktowania owych zagadnień.

Przygotowana przez Panią mgr Adrianę Grabowską rozprawa doktorska jest długa i liczy aż 165 stron i jest podzielona w sposób klasyczny na wprowadzenie, materiały i metody, cel pracy, wyniki, dyskusję oraz wnioski i perspektywy. Jest ponadto zaopatrzona w streszczenia przygotowane w języku polskim i angielskim oraz dobrze zredagowane spisy: treści, prac naukowych ze współautorstwem doktorantki oraz stosowanych skrótów. Spisy te znacznie ułatwiają nawigowanie po obszernej pracy. Na końcu rozprawy znajduje się bibliografia zawierająca dobrze dobraną i aktualną literaturę przedmiotu na którą składają się aż 342 pozycje.

Wstęp rozprawy jest poprawny, zawiera niezbędne informacje wprowadzające czytelnika w meandry poruszanych zagadnień i dostarcza niezbędnej wiedzy dla zrozumienia dalszych części rozprawy. Jest napisany klarownym, naukowym językiem. Wstęp świadczy o bardzo dobrej znajomości przedmiotu przez doktorantkę, czytelnie charakteryzuje rolę snoRNA a także krótkiego RNA pochodzące z snoRNA. Zawiera także dobrze zredagowane tabele i bardzo staranne i informatywne ryciny. Co istotne, jest to zarazem dobrze przygotowane uzasadnienie dla podjęcia danego tematu badań.

Tym samym stwierdzam, że rozprawa doktorska prezentuje bardzo dobrą, ogólną wiedzę teoretyczną doktorantki w dyscyplinie nauki biologiczne.

Do tej części rozprawy mam jedynie kilka drobnych uwag głównie redakcyjnych. Na stronie tytułowej przytrafił się błąd w skrócie ICHB PAN – brakuje litery „B”. Doktorantka stosuje także niezręczne sformułowania np. „podtypowanie GBM” – w słowniku języka polskiego PWN nie występuje takie słowo; „plazma” zamiast polskiego słowa osocze; sformułowanie „białko (lub gen) może ulec podwyższeniu” lub jako synonim „regulacja genu w

górze” – zapewne chodzi o zwiększoną ekspresję lub nadekspresję; zdarzają się także niezrozumiałe skróty myślowe np.: „Dodatkowo, niedostateczna podaż składników odżywczych spowodowana niedotlenieniem...” – niedotlenienie nie płывa bezpośrednio na podaż składników odżywczych; zabrakło mi także bliższej charakterystyki skutków molekularnych mutacji wymienianych w tabeli 1 – np. czy są to mutacje aktywujące czy inaktywujące. Są to jednak niedociągnięcia drobne nie wpływające na moją dobrą oceną wstępu rozprawy.

Rozdział poświęcony materiałom i metodom jest przygotowany starannie. Zaopatrzone jest w szereg tabel, które ułatwiają uzyskanie informacji o odczynnikach i warunkach prowadzonych reakcji. Rozdział ten zawiera niezbędne informacje umożliwiające prześledzenie prowadzonych eksperymentów. Doktorantka opiera się zarówno o wyniki analiz wysokoprzepustowych jak i wykazuje biegłość w znacznej liczbie szeroko stosowanych technik laboratoryjnych takich jak real-time qPCR, immunoprecypitacji z sieciowaniem, transfekcji konstruktami genetycznymi, FISH czy hodowli komórkowych. Co chciałbym podkreślić zdecydowana większość przeprowadzonych eksperymentów z wykorzystaniem wymienionych technik jest zaprojektowana poprawnie.

Tym samym stwierdzam, że rozprawa doktorska w pełni wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez doktorantkę.

Mam jednak zasadniczą uwagę do części omawianego rozdziału dotyczącej się izolacji wolno-krażącego RNA jak również opisu wykorzystanego wektora do nadekspresji genu *FUS*. Procedura izolacji wolno-krażącego RNA opisana na stronie 67 rozprawy jest w mojej opinii niekompletna. Wątpliwości budzi czas kilku godzin przechowywania próbek krwi przed izolacją. Czas ten powinien być ściśle monitorowany i nie przekraczać 2h. Doktorantka nie wspomina także o kontroli hemolizy uzyskanych próbek co jest kluczowe w przygotowaniu tego materiału. Próbkę z oznakami hemolizy nie powinny być dalej analizowane. W rozprawie brakuje także zdjęć żeli agarozowych, o których pisze doktorantka, które mają wskazywać na zachowanie integralności RNA. Jeśli natomiast chodzi o nadekspresję genu *FUS* to w pierwszej kolejności brakuje mapy stosowanego wektora. Brakuje także informacji czy chodziło o transfekcję przejściową czy stałą ale ze względu na krótki czas hodowli zakładam, że była to transfekcja przejściowa nie wymagająca zgód GMM/GMO. Moim zdaniem również kontrola wykorzystana w tych eksperymentach, mianowicie komórki poddane transfekcji mieszaniną niezawierającą plazmidu jest nieprawidłowa. Odpowiednią kontrolą byłyby komórki transfekowane pustym plazmidem nie zawierającym transgeny.

Dla porządku chciałbym również zwrócić uwagę, że dr Marcin Sajek, który przeprowadził analizę bioinformatyczną wykorzystaną w niniejszej rozprawie jest pracownikiem

Instytutu Genetyki Człowieka PAN a nie Uniwersytetu w Kolorado, gdzie przebywa jedynie tymczasowo w ramach stażu podoktorskiego.

Kolejny rozdział jest poświęcony celom rozprawy. Tak jak wspominałem już wcześniej cele są bardzo ambitne i nowatorskie. Uważam jednak, że mnogość zadań stawianych przed doktorantką i poziom ich trudności był zbyt wysoki. Ich zakres mógłby stanowić materiał do habilitacji nic więc dziwnego, że zostały potraktowane jedynie powierzchownie i ostatecznie nie dały oczekiwanych odpowiedzi. Nie zgadzam się więc z konkluzją doktorantki ze strony 74, że „Założone cele zostały osiągnięte...”.

Mam szereg uwag co do otrzymanych wyników i płynących z nich wniosków. Jeśli chodzi o ocenę poziomu cząsteczek sdRNA wykonanych na tkankach od pacjentów z glejakiem, to większość badanych cząsteczek wykazuje bardzo niską liczbę odczytów na milion. Wydaje się błędem wspomnianie o cząsteczkach, których RPM jest < 10 . Stosując takie kryterium pozytywne wyniki ograniczyłyby się zaledwie do kilku cząsteczek. Pozostałe są na poziomie artefaktów. W przeprowadzonej następnie, bardzo cennej walidacji, posłużono się tylko opisem krotności zmiany natomiast interesujące jest również jakie było ct reakcji PCR. Obawiam się, że dla większości reakcji ct było bardzo wysokie (późny cykl). Stąd, rycina 5 zawiera niewątpliwie cenne wyniki o dużym znaczeniu naukowym ale należy od nich odsortować wyniki wątpliwe. Doktorantka padła zapewne ofiarą pokusy częstej u młodych badaczy aby pokazać wszystko co zostało wykonane zamiast skupić się na wynikach najistotniejszych.

Badania mające na celu sprawdzenie potencjału diagnostycznego badanych cząsteczek w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych oraz osoczu pacjentów dotyczą tylko wierzchołka góry lodowej i dostarczają nieprzekonujących wyników. Poszukiwanie markerów to żmudna, wieloletnia praca, w której nie można iść na skróty natomiast badania w niniejszej rozprawie zostały przeprowadzone na bardzo małej liczbie linii komórkowych i pacjentów, nie zostały potwierdzone w niezależnej grupie pacjentów, nie sprawdzono wpływu wieku, płci, palenia, chorób towarzyszących i innych czynników na otrzymany wynik abstrahując od kwestii technicznych dotyczących izolacji próbek o czym pisałem wcześniej. Docenić chciałbym natomiast umiejętne wykorzystanie przez doktorantkę programu RNA fold i ciekawe przewidywania dotyczące struktury drugorzędowej badanych cząsteczek. Widać tutaj doskonałą ekspertyzę w naukach biologicznych i chemicznych ICHB PAN.

Dalej wyniki dotyczące korelacji między ekspresją prekursorów a cząsteczek w nich kodowanych dostarczają sprzecznych wyników. Wykazano korelację dla cząsteczek 1_707-5p i -3p z prekursorową SNORA77 ale z kolei SNORA77 ma niższą ekspresję u chorych niż w

zdrowym mózgu a kodowane w niej cząsteczki odwrotnie – to nie ma sensu. W dyskusji doktorantka słusznie argumentuje, że dla tego rodzaju transkryptów nie można spodziewać się klasycznych korelacji jak ma to miejsce np. w przypadku ekspresji genów prekursorowych i miRNA. Z drugiej jednak strony, powtarzający się brak logicznych powiązań dla SNORA77 czy brak korelacji dla SNORA81 i hsa-miR-1248 może raczej obrazować ogólne zaburzenia w regulacji syntezy jak i degradacji powstających transkryptów w komórkach nowotworowych. Stąd obserwowane zmiany mogą równie dobrze nie być przyczyną a jedynie efektem ubocznym choroby. Zastanawiałem się również czy wykonano analizę stabilności ekspresji stosowanych genów referencyjnych w różnych tkankach. Brak stabilności genów referencyjnych mógłby tłumaczyć między innymi dziwny wynik otrzymany dla zdrowych fibroblastów przedstawiony na rycinie 17.

Z kolei bardzo pozytywnie oceniam eksperymenty wykonane na frakcjonowanym materiale. Eksperymenty te są bardzo eleganckie i pokazują wiarygodnie lokalizację subkomórkową badanych cząsteczek. Wysoko oceniam także przeprowadzone analizy FISH, które są spójne i walidują wyniki molekularne. Co istotne, doktorantka wykazała odmienny od kanonicznego dla miRNA mechanizm biogenezy hsa-miR-1248. Jest to cenny wynik wzbogacający aktualną wiedzę na temat powstawania tych cząsteczek.

Intrygujący jest też efekt delecji jak i nadekspresji białka *FUS* na poziomie badanych cząsteczek. Co istotne, uzyskane wyniki są zgodnie z oczekiwaniami przeciwstawne w obu eksperymentach oraz powtarzalne w trzech badanych liniach komórkowych co świadczy o technicznie bardzo dobrze przeprowadzonym eksperymencie. Wartościowy jest też wynik immunoprecypitacji białka *FUS* z badanymi cząsteczkami, który wyraźnie wskazuje na wiązanie SNORA77 przez *FUS*. Zgadzam się więc w tej kwestii z doktorantką, że uzasadniony jest wniosek, że białko to bierze udział w biogenezie tej cząsteczki co jest ciekawym odkryciem. Analogiczne eksperymenty immunoprecypitacji przeprowadzone dla białek *DROSHA* i *AGO2* są już dużo mniej przekonujące.

Podsumowując tę część pracy uważam, że zawiera ona zdecydowanie za dużo zbędnych analiz, które nie dostarczają informatywnych wyników a jedynie zaciemniają ogólny obraz rozprawy czyniąc ją trudną w odbiorze. Mam tu na myśli zbędne opisy w części poświęconej wynikom innych białek wiążących snoRNA w tym analiz ich ekspresji, analizy w warunkach hipoksji a także analiz frakcji komórek macierzystych GCB. Sądzę, że zrezygnowanie z tych części wniosłoby większą przejrzystość do rozprawy i pozwoliło na lepsze utrzymanie linii wyводу, który w obecnej formie często się urywa. W tym kontekście warto zaznaczyć, że praca jest napisana w tradycyjny sposób i brakuje w niej dobrego „story telling”, który prowadząc czytelnika od eksperymentu do eksperymentu mógłby ułatwić śledzenie kolejnych etapów

rozprawy. Nie mniej jednak zawiera ona szereg ciekawych i nowych dla nauki wyników co jest niewątpliwie sukcesem doktorantki. Wyniki te na pewno zasługują na publikację.

Mając powyższe na uwadze stwierdzam, że ta część recenzowanej rozprawy doktorskiej stanowi oryginalne rozwiązanie stawianego problemu naukowego.

Przejdę teraz do oceny dyskusji. Doktorantka odwołuje się do bardzo dużej liczby publikacji i poprawnie sytuuje swoje wyniki w odniesieniu do danych literaturowych. Często ogranicza się niestety jedynie to krótkiego stwierdzenia co wykrył cytowany autor. Bardziej istotny jest jednak fakt, że w dyskusji znaleźć można elementy nadinterpretacji uzyskanych wyników i zbyt daleko idących spekulacji nie popartych wynikami eksperymentalnymi. Poniżej podam kilka przykładów:

- str. 138 doktorantka argumentuje, że różny poziom ekspresji sdRNA pochodzących ze SNORA77 w nowotworach, a nawet w nowotworach o tym samym pochodzeniu świadczy o ich potencjale diagnostycznym – nie mogę się zgodzić z tym stwierdzeniem, zdecydowanie wyższy potencjał diagnostyczny mają cząsteczki unikatowe dla danego typu bądź podtypu nowotworu;

- str. 140 omawiane są wyniki immunoprecypitacji białka FUS, następnie pada stwierdzenie, że potwierdzono w ten sposób wiązanie ze wszystkimi badanymi cząsteczkami sdRNA oraz, że niewykluczone, że cząsteczki te biorą udział w regulacji ekspresji genów poprzez wiązanie do chromatyny wraz z białkiem FUS – pierwsza część jest nadinterpretacją, wzbogacenie dla 1_707-3p jest słabe, druga część jest jedynie spekulacją;

- mechanizm działania hsa-miR-1248 przedstawiony na rycinie 35 jest zbyt spekulatywny;

- str. 141 pada stwierdzenie „Przedstawione wyniki dotyczące hsa-miR-1248 mogą świadczyć o wysokim poziomie tej cząsteczki w populacji GSC znajdującej się w regionie okołonaczyniowym na obrzeżach guza, a nie w hipoksyjnym w jego środku, co sugeruje jej udział w progresji GBM” – jest to ponownie spekulacja;

- str. 143 doktorantka pisze „Niewykluczone, że cząsteczki te wiążąc się z białkami wiążącymi chromatynę wpływają na jej konformację, a co za tym idzie transkrypcję genów, również tych związanych z nowotworzeniem” – to jest spekulacja, rozprawa nie dostarcza żadnych dowodów, że cząsteczki te regulują ekspresję genów a tym bardziej tych związanych z nowotworzeniem;


- str. 143 doktorantka pisze, że obecność badanych SNORA w EV sugeruje ich udział w modulacji mikrośrodowiska guza – to znów jest spekulacja, sama obecność cząsteczek w EV nie świadczy o ich funkcji. Z powodzeniem więc dyskusja mogłaby być krótsza i odnosić się jedynie do faktów.

Całość rozprawy kończą wnioski, które są próbą odpowiedzi na pytania sformułowane na wstępie. Zgadzam się z wnioskiem płynącym z punktu pierwszego, że doktorantka z powodzeniem zidentyfikowała grupę sdRNA potencjalnie zaangażowanych w rozwój GBM choć bezpieczniej byłoby powiedzieć – deregulowanych w GBM. Wniosek drugi jest nadinterpretacją tak jak pisałem wcześniej. Zgadzam się z wnioskiem trzecim natomiast wnioski czwarty w części poświęconej dokładnej roli badanych cząsteczek jest spekulacją. Wniosek piąty i szósty to hipotezy. Częściowo zgadzam się z wnioskiem siódmym. Większość z wyszczególnionych tu wątpliwości mogłyby rozwiązać jedynie eksperymenty funkcjonalne mające na celu odpowiedzieć na konkretne pytanie naukowe np. czy badane sdRNA mają zdolność modulacji mikrośrodowiska guza albo czy SNORA81 z lub bez AGO2 wpływa na splicing.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Adriany Grabowskiej jest próbą podjęcia niezwykle ciekawego i ambitnego zagadnienia jednak zakrojona zbyt obszernie. Co chciałbym podkreślić praca zawiera szereg ciekawych i istotnych naukowo wyników wnoszących do obecnego stanu wiedzy. Doktorantka nie ustrzegła się jednak błędów w projektowaniu kilku eksperymentów a co bardziej istotne w interpretacji wyników i wyciąganiu wniosków z nich płynących.

Nie mniej jednak stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska przygotowana przez mgr Adrianę Grabowską spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668), Ustawie z dnia 3 lipca 2018 roku. 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 28/2024/Internet z dnia 20 marca 2024 r.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie mgr Adriany Grabowskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Maciej Giefing

DYREKTOR
Instytutu Genetyki Człowieka PAN

prof. dr hab. Maciej Giefing