



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

**dr hab. Prof. UJ, Joanna Dulińska-Litewka**  
**Katedra Biochemii Lekarskiej Collegium Medicum Uniwersytet Jagielloński, 31-034**  
**Kraków ul. Kopernika 7 PL**

**Kraków, 28-08-2024**

**Recenzja rozprawy doktorskiej przedstawionej na stopień doktora nauk biologicznych, w dziedzinie nauki ścisłe i przyrodnicze mgr Adriany Grabowskiej, pt.: „Identyfikacja i charakterystyka regulatorowych RNA (sdRNA oraz snoRNA) w glejaku wielopostaciowym - ich udział w rozwoju i progresji nowotworu”.**

***Promotor:***

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

#### **Ocena formalna**

Poddana ocenie rozprawa doktorska została wykonana w Zakładzie Neuroonkologii Molekularnej w Instytucie Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu, pod kierunkiem dr hab. Prof. ICHB PAN Katarzyny Rolle.

Głównym celem pracy doktorskiej była identyfikacja i zarówno charakterystyka nowej klasy regulatorowych RNA – sdRNA z ich prekursorowi snoRNA oraz określenie ich roli w rozwoju i progresji glejaka wielopostaciowego (GBM). Istotnym elementem prowadzonych badań była także ocena ich potencjału prognostycznego oraz diagnostycznego, a zarazem określenie potencjalnych mechanizmów powstawania cząsteczek sdRNA. Cele pracy zostały zrealizowane w oparciu o hipotezy badawcze analogiczne do postawionego celu badawczego:

1. Identyfikacja i ocena poziomu sdRNA oraz ich snoRNA w glejaku wielopostaciowym
2. Ocena potencjału prognostycznego i diagnostycznego wybranych sdRNA oraz snoRNA w glejaku wielopostaciowym
3. Ogólna charakterystyka i badanie potencjalnych funkcji wybranych sdRNA oraz ich prekursorowych snoRNA
4. Badanie mechanizmów powstawania sdRNA

Zaproponowane i wykonane badania, ze względu na brak terapii, która skutkowałaby całkowitym wyleczeniem pacjentów chorujących na glejaka wielopostaciowego, oraz przedstawione wyniki przeprowadzonych badań mogą posłużyć do zaproponowania nowych podejść terapeutycznych.

Temat ocenianej rozprawy doktorskiej jest nowatorski, a zawarte w niej wyniki mają charakter oryginalny są prawidłowo udokumentowane i scharakteryzowane. Praca jest obszernym, liczącym 165 stron manuskrytem z podziałem na podrozdziały charakterystycznym w przypadku dysertacji w zakresie biologii molekularnej. Jest napisana w poprawnym językiem

Katedra Biochemii Lekarskiej

31-034 Kraków, ul. Kopernika 7, tel. +48 12 422 74 00, faks +48 12 422 32 72, e-mail: kbl\_sekr@cm-uj.krakow.pl

www.biochemia.cm-uj.krakow.pl

polskim z uwzględnieniem terminów, skrótów stosowanych w zakresie biologii molekularnej. Stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca przygotowana przez mgr Adrianę Grabowską spełnia formalnie wszystkie wymogi stawiane przed rozprawami doktorskimi.

### **Ocena merytoryczna**

Przedstawiona do oceny praca doktorska rozpoczyna się od wykazu prac naukowych - 3 przyjętych do druku i 3 wysłanych do druku manuskryptów, w których mgr Adriana Grabowska jest współautorem. Dwie z opublikowanych prac posiadają wysoki IF, a wszystkie zawierają informacje omawiane w dysertacji. Następnie umieszczona jest lista stosowanych skrótów w opisanej dysertacji, kolejno streszczenie w języku polskim i angielskim. Wprowadzenie, w którym Doktorantka przedstawiła dostępne dane literaturowe, zaczynając od podkreślenia znaczenia prowadzonych badań nad nowotworami ośrodkowego układu nerwowego (OUN), poprzez przedstawienie klasyfikacji nowotworów pochodzenia glejowego u dorosłych z uwzględnieniem szczegółowej charakterystyki glejaka wielopostaciowego i obowiązujących klasyfikacji tego nowotworu, a kończąc na charakterystyce niekodujących RNA (ncRNA), poprzez charakterystyką małych jąderkowych RNA (snoRNA) i krótkich RNA pochodzących ze snoRNA (sdRNA), a więc cząsteczek RNA związanych z nowotworami, w tym również funkcjonalnie powiązanych z glejakiem wielopostaciowym. W rozdziale tym mgr Adrian Grabowska opisała dokładnie charakterystykę GBM, metody stosowane w diagnostyce glejaka, a także omówiła sposoby jego leczenia. Dowiadujemy się z tej części pracy, że stosowane obecnie terapie skierowane przeciwko glejakowi wielopostaciowemu nie są odpowiednio skuteczne, co jednoznacznie wskazuje na potrzebę poszukiwania innych podejść w leczeniu tego agresywnego nowotworu OUN. Wiadomo, że pomimo stosowanych strategii terapeutycznych, wznowa GBM jest niemal pewna ze względu na wysoką oporność tego nowotworu na chemioterapię czy radioterapię. Obiecującym podejściem wydają się terapia adjuwantowa, terapia inhibitorami celującymi, Laserowa Termoterapia Śródmiąższowa czy immunoterapia. Doktorantka skupiła się następnie na charakterystyce profilu molekularnego GBM jako wprowadzenie do konieczności zrozumienia mechanizmów patofizjologicznych tego nowotworu, omówiła najczęściej występujące mutacje i zmiany molekularne obserwowane w glejaku oraz przedstawiła markery molekularne stosowane przy podziale tej choroby na poszczególne podtypy. Poszukiwanie biomarkerów GBM jest nieodzownym elementem badań w kierunku skutecznej strategii zarówno diagnostycznej jak i terapeutycznej. Biomarkery mogą bowiem występować jako wolno krążące cząsteczki a także mogą być obecne w krążących komórkach nowotworowych czy pęcherzykach zewnątrz-komórkowych (EV). W bardzo interesujący sposób przedstawia doktorantka opis samego mikro-środowiska nowotworu (TME), rolę środowiska hipoksyjnego czy też udział EV w komunikacji międzykomórkowej w obrębie nowotworu jak i opis komórek macierzystych GBM (GSC). Ważnym podrozdziałem części wstępnej rozprawy mgr Adrian Grabowskiej jest fragment opisujący krótkie RNA pochodzące z snoRNA, potencjalne mechanizmy ich powstawania w zależności od aktywności różnych enzymów. Ciekawe były dla mnie przedstawione przez Doktorantkę informacje dotyczące udziału snoRNA w typowych procesach biochemicznych w różnych typach nowotworów.

Rozdział zatytułowany Wprowadzenie został napisany bardzo interesująco i, co więcej, doskonale wprowadza czytelnika w dalsze części przedstawionej do oceny pracy doktorskiej. Doktorantka szczegółowo przedstawiła stan wiedzy na temat glejaka wielopostaciowego, dane oparte zostały na najnowszej literaturze. Doktorantka omówiła także efekty wywołane niedostateczną podażą składników odżywczych spowodowaną niedotlenieniem które sprzyja zmianom genetycznym. Niedotlenienie komórek GBM jest silnie powiązane z inwazją nowotworu oraz opornością na leczenie a niedotlenione regiony sprzyjają utrzymaniu i ekspansji GSC. Odpowiedzią komórek nowotworowych na niesprzyjające warunki środowiska, takim jest hipoksja, jest autofagia, jednak jej wpływ na komórki GBM pozostaje niejednoznaczny. Autofagia może chronić komórki nowotworowe przed chemio- i radioterapią, z drugiej strony zaś może hamować wzrost komórek i wywoływać starzenie się. Autofagia jest takim procesem komórkowym; który wykazuje specyficzną dla komórki i zależną od kontekstu TME rolę w progresji GBM, prowadząc do promowania lub hamowania progresji GBM. Autofagia może regulować funkcję komórek GBM bezpośrednio poprzez regulację przeżycia, migracji i inwazji lub pośrednio poprzez wpływ na skład TME GBM, taki jak populacja komórek odpornościowych, metabolizm guza i komórki macierzyste glejaka. Proszę, na podstawie najnowszych doniesień zaproponować rolę autofagii w patofizjologii GBM.

Część przeglądu literaturowego przygotowanego przez mgr Adrianę Grabowską została poświęcona cząsteczkom miRNA. Tak jak opisano, wśród regulatorowych krótkich RNA, najlepiej przebadaną grupą są miRNA. Cząsteczki te zostały opisane zarówno jako supresory, jak i onkogeny w GBM. Najbardziej znanym onkogenem w GBM jest miR-21, który jest zaangażowany w regulację apoptozy, proliferację i oporność na chemioterapię. Innymi szeroko badanymi onkogenami w GBM są miR-93 i miR-10b, regulujące takie procesy, jak proliferacja, migracja, inwazja czy chemiooporność, a ekspresja miR-10b była dodatkowo pozytywnie skorelowana z stopniem zaawansowania GBM. Z kolei wśród miRNA pełniących funkcje supresorowe w GBM, najszerzej opisanymi są miR-7, miR-34a czy miR-128.

Badacze nauczyli się „oszukiwać” komórki nowotworowe, aby pochłaniały omawiane w przedstawionej pracy cząsteczki – mikroRNA, a m.in. dlatego, że cząsteczka mikroRNA-34 zatrzymuje podziały komórkowe. Jednocześnie cząsteczka blokuje aktywność kilku genów, które napędzają nowotwory i chronią je przed antyrakowymi terapiami. Do zwalczania raka, może być zastosowana samodzielnie oraz w połączeniu ze stosowanymi lekami. Może mieć szczególne znaczenie w przypadkach, gdzie rak wykształcił odporność na tradycyjne metody leczenia. W zdrowych komórkach wspomniane mikroRNA-34b występuje w dużych ilościach, jednak w komórkach raka cząsteczki tej zwykle brakuje. Trudności, które są napotykanymi to fakt, że RNA szybko się rozpada, proszę o wyjaśnienie jakie metody do stabilizacji cząsteczek są podejmowane, na jak długo można przedłużyć ich „życie”? Dodatkowo, czy są podejmowane próby obserwacji cząsteczek wnikania do komórek raka, w tym także do komórek GBM?, czy konieczna jest dodatkowa modyfikacja badanych cząsteczek?? Jakich efektów można się spodziewać w przypadku glejaka??

Rozdział zatytułowany Wprowadzenie został napisany interesująco i, co więcej, doskonale wprowadza czytelnika w dalsze części przedstawionej do oceny pracy doktorskiej. Jest to wyczerpujące omówienie stanu wiedzy na temat glejaka wielopostaciowego, oparte na

najnowszej literaturze naukowej. Należy podkreślić, że spis literatury zamieszczony w pracy doktorskiej przygotowanej przez mgr Adrianę Grabowską jest naprawdę imponujący i liczy aż 342 pozycje.

Kolejny rozdział przedstawiony w dysertacji to Materiały i metody. Ta część rozprawy została napisana przez Doktorantkę bardzo przejrzyście i starannie. Nie mam żadnych wątpliwości, że na podstawie zamieszczonych opisów można powtórzyć wykonane przez mgr Adrianę Grabowską doświadczenia, a obejmują one szeroki wachlarz metodyki. Brakującym elementem jest sprecyzowanie ilości białka używanego w technice Western blot. Proszę wyjaśnić jakie ilości białka były wykorzystane do analizy ekspresji białek oraz w jaki sposób wykonano obliczenia dotyczące różnic w ekspresji danego białka. Należy podkreślić że w przeprowadzonej pracy zastosowano odpowiednią sekwencję wykonywanych zadań, a dodatkowo do badań wykorzystano w podstawowym układzie linie komórkowe, oraz tkanki natomiast różnicową analizę poziomu sdRNA i snoRNA w EV przeprowadzono w wyniku wyizolowania z plazmy krwi pacjentów ze zdiagnozowanym GBM, co podkreśla różnorodność zastosowanego materiału do analizy. Nie mam zastrzeżeń do tej części pracy z wyjątkiem wymienionych obliczeń. W następnym rozdziale Autorka ocenianej rozprawy nakreśliła główne cele swojej pracy doktorskiej. Z tej części dysertacji dowiadujemy się, że głównym celem podjętych badań była identyfikacja i charakterystyka nowej klasy regulatorowych RNA – sdRNA wraz z ich prekursorowymi snoRNA, a także określenie ich roli w rozwoju i progresji GBM. Ważnymi elementami badań była również ocena ich potencjału prognostycznego oraz diagnostycznego, jak i potencjalnych mechanizmów powstawania sdRNA. Cele w ocenianej rozprawie zostały sformułowane bardzo jasno, są ambitne, ale możliwe do osiągnięcia w trakcie wykonywanej pracy. Kolejny etap to przedstawionej dysertacji to rozdział poświęcony uzyskanym wynikom.

Badania rozpoczęto od oceny poziomu cząsteczek sdRNA oraz ich prekursorów snoRNA w GBM. Na podstawie wyników sekwencjonowania wykonanego w Zakładzie Neuroonkologii Molekularnej ICHB PAN pozyskano dane dotyczące liczby odczytów dla cząsteczek sdRNA wraz z ich pochodzeniem. Sekwencjonowanie zostało przeprowadzone z wykorzystaniem tkanek pacjentów ze zdiagnozowanym GBM w celu oceny transkryptomu krótkich ncRNA w GBM. Wyniki przeprowadzonego sekwencjonowania RNA pozwoliły na identyfikację 23 cząsteczek sdRNA. Ponad 50 % zidentyfikowanych cząsteczek to nieadnotowane wcześniej w bazach danych cząsteczki, pozostałe natomiast to znane cząsteczki miRNA mogące pochodzić z cząsteczek snoRNA. Największą ich liczbę sumarycznie we wszystkich badanych próbach odnotowano dla cząsteczek hsa-miR-664a-3p (suma = 493,99), hsa-miR-664b-3p (suma = 45,34) oraz hsa-miR 3607-5p (suma = 44,68), najmniejszą natomiast dla cząsteczek 3\_2423-3p, hsa-miR-664b-5p, hsa-miR-3607-3p, 20\_10089-3p, hsa-miR-1291, 20\_10199-3p, hsa-miR-3651 oraz 17\_9367 3p (wyniki umieszczono w Tabeli). Przeprowadzone sekwencjonowanie RNA umożliwiło identyfikację cząsteczek sdRNA o zmienionym poziomie w tkankach pochodzących od pacjentów ze zdiagnozowanym GBM. W celu identyfikacji sdRNA potencjalnie zaangażowanych w rozwój GBM, walidacji poddano 15 cząsteczek sdRNA, dla których odnotowano sumaryczną wartość RPM > 1 wraz z ich prekursorowymi cząsteczkami snoRNA. Walidacja została przeprowadzona za pomocą metody RT-qPCR z wykorzystaniem 12 tkanek pochodzących od pacjentów ze zdiagnozowanym GBM. Jako kontroli użyto komercyjnie

dostępnego RNA pochodzącego ze zdrowego mózgu. Dla ponad 50 % cząsteczek sdRNA obserwowano podwyższony poziom w GBM w porównaniu do zdrowego mózgu, ale niższy w porównaniu do prekursorów snoRNA. Cząsteczki sdRNA pochodzące z prekursorowego SNORD125 wykazują ponad 1,5-krotny wzrost poziomu w porównaniu do zdrowego mózgu przy jednoczesnym prawie 3-krotnie niższym dla cząsteczki hsa-miR-3653-3p i ponad 4-krotnie niższym dla cząsteczki hsa-miR 3653-5p poziomie w porównaniu do SNORD125. SdRNA hsa-miR-664a-3p oraz hsa-miR-664a-5p pochodzące ze SNORA36B wykazują ponad 5-krotnie wyższy poziom w tkankach GBM aniżeli w zdrowym mózgu i jednocześnie ponad 2,5-krotnie niższy oraz 1,5 krotnie niższy poziom dla kolejno hsa-miR-664a-3p i hsa-miR-664a-5p w porównaniu z SNORA36B. W przypadku cząsteczki hsa-miR-664b-3p pochodzącej ze SNORA36A obserwowano jej prawie 3-krotny wzrost względem zdrowego mózgu, z jednoczesnym ponad 4,5-krotnie wyższym poziomem jej prekursora SNORA36A. Podobnie jest w przypadku cząsteczki 20\_10199-5p pochodzącej ze SNORA60, której poziom jest 2,5-krotnie wyższy aniżeli w kontroli i jednocześnie ponad 5-krotnie niższy niż SNORA60 (Ryc. 5 F). Ponadto, SNORA36B, SNORA36A, jak i SNORA60 wykazują najwyższy poziom wśród walidowanych snoRNA, który jest ponad 12-krotnie wyższy w tkankach GBM niż w zdrowym mózgu. SdRNA 17\_9367-5p wykazuje prawie 6-krotnie wyższy poziom w tkankach GBM w odniesieniu do kontroli, natomiast sdRNA 2\_1843-3p ponad 2 krotnie wyższy. Poziom obydwu tych cząsteczek jest 1,5-krotnie niższy niż ich prekursorów, kolejno SNORA38B i SCARNA6. Kolejny etap to ocena potencjału diagnostycznego wybranych cząsteczek sdRNA oraz snoRNA w podtypach GBM. Poziom wszystkich badanych sdRNA, jak i snoRNA nie różnił się znacznie między podtypami molekularnymi GBM. Dla cząsteczki 1\_707-3p, najwyższy poziom odnotowano w podtypie mezenchymalnym, charakteryzującym się najwyższą agresywnością, a najniższy w podtypie proneuralnym o najniższej agresywności. W podtypie mezenchymalnym wysoki poziom odnotowano dla sdRNA hsa-miR-664a-3p, a w podtypie proneuralnym wysoki poziom zaobserwowano dla cząsteczek hsa-miR-3653-3p i hsa-miR-365. Odnośnie prekursorowych cząsteczek snoRNA, prawie wszystkie cząsteczki za wyjątkiem SNORA77 oraz SNORA60 w podtypie proneuralnym, wykazywały wysoki poziom we wszystkich podtypach. W celu oceny udziału badanych w niniejszej pracy cząsteczek sdRNA oraz ich prekursorowych snoRNA w rozwoju i progresji GBM, sprawdzono, czy cząsteczki te mogą być sekwestrowane poza komórkę i są obecne w EV. Przy użyciu gotowego zestawu odczynników, przeprowadzono izolację EV z medium hodowlanego linii komórkowych U-251 MG oraz U 118 MG, a poprawność wykonanej izolacji potwierdzono analizą Western Blot z użyciem przeciwciała specyficznego dla białka CD63 będącego markerem EV. Eksperyment potwierdził obecność tego białka we frakcji EV zarówno w linii komórkowej U 251 MG a także U-118 MG. Heatmapy przedstawiają poziom wybranych sdRNA oraz snoRNA w podtypach GBM oraz poziom wybranych sdRNA oraz snoRNA w EV w linii komórkowej U-118 MG i U-251 MG. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości  $\pm$  SD o istotności statystycznej  $p < 0,05$  i znormalizowano względem genów referencyjnych. Aby ocenić potencjał diagnostyczny badanych w niniejszej pracy sdRNA oraz ich prekursorowych snoRNA, sprawdzono ich obecność w plazmie pacjentów ze zdiagnozowanym 85 GBM ( $n = 4$ ). W przypadku cząsteczek snoRNA, jedynie SNORA77 i SNORA63 obecne były w plazmie wszystkich pacjentów, SNORA81 obecna była w 75 % prób,

natomiast SNORA38B, SNORD138 i SNORA60 w jednej próbie. W przeciwieństwie do wolnokrążących cząsteczek w plazmie, te obecne w EV charakteryzują się większą stabilnością, co czyni je obiecującymi biomarkerami GBM. Pozyskanie RNA wyizolowanego z EV obecnych w plazmie pacjentów ze zdiagnozowanym GBM pozwoliłoby ocenić, czy obecne w EV cząsteczki sdrRNA, jak i snoRNA są w stanie przekroczyć BBB i dostać się do krwioobiegu, jak również, czy te obecne w plazmie są wolnokrążące, czy znajdują się w EV. Doktorantka sugeruje, że aby ocenić potencjał diagnostyczny cząsteczek sdrRNA i snoRNA, należałoby porównać ich poziom w plazmie pacjentów z GBM z plazmą zdrowych osób. Czy takie próby zostały wykonane, czy planuje się przeprowadzenie takiej analizy??.

Kolejny, bardzo istotny etap wykonywanej pracy to charakterystyka wybranych cząsteczek sdrRNA oraz snoRNA w celu określenia potencjalnej roli cząsteczek sdrRNA w GBM. Do przeprowadzonych analiz wybrano cząsteczki sdrRNA charakteryzujące się najwyższym poziomem w tkankach GBM w porównaniu do zdrowego mózgu, jak i wyższym poziomem w porównaniu do ich prekursorów snoRNA: 1\_707-5p wraz z prekursorową SNORA77 oraz hsa-miR-1248 wraz z prekursorową SNORA81. Dodatkowo, w celu oceny potencjalnego oddziaływania między cząsteczkami sdrRNA pochodzącymi z tej samej prekursorowej, wybrano również cząsteczkę 1\_707-3p pochodzącą ze SNORA77. Celem ustalenia, w którym miejscu struktury snoRNA lokują się pochodzące z nich cząsteczki sdrRNA, wygenerowano struktury drugorzędowe snoRNA z użyciem narzędzia RNAfold. Aby określić, czy proporcja między sdrRNA a ich prekursorami zmienia się w zależności od stanu chorobowego, oceniono również poziom tych cząsteczek znormalizowany do genów referencyjnych w zdrowym mózgu oraz w tkankach GBM. W przypadku cząsteczek sdrRNA 1\_707-5p oraz 1\_707-3p odnotowano wyższy poziom w GBM w odniesieniu do zdrowego mózgu, natomiast dla ich prekursorowej SNORA77 zaobserwowano odwrotny stosunek – poziom cząsteczki SNORA77 był wyższy w zdrowym mózgu aniżeli w GBM.

Doktorantka przeprowadziła także ocenę zależności między snoRNA a ekspresją „genów gospodarza” a także ocenę tkankowo-zależnej specyficzności występowania a badania przeprowadzono na wybranych sdrRNA oraz snoRNA w liniach komórkowych GBM i nie-GBM. W tym celu oceniono ich poziom w zaproponowanych liniach komórkowych: zdrowej linii fibroblastów płucnych (MRC-5), zdrowej linii nerki (HEK-293), liniach pochodzących z raka jelita grubego (Caco-2) i raka wątroby (HepG2) oraz czterech liniach komórkowych GBM (U-118 MG, U-251 MG, U-138 MG, U-87 MG). Cząsteczka hsa-miR-1248 wykazała podwyższony poziom we wszystkich liniach GBM w porównaniu do innych nowotworów, czy zdrowych tkanek. Analogiczne wyniki obserwowano dla cząsteczki SNORA77, z wyjątkiem jej wysokiego poziomu w zdrowych fibroblastach płucnych (ponad 100-krotnie wyższy niż w innych liniach komórkowych nie-GBM i około 5-krotnie wyższy poziom niż w GBM). Wysoki poziom w linii komórkowej MRC-5 odnotowano również dla sdrRNA 1\_707-3p pochodzącej ze SNORA77. Druga pochodna SNORA77 – 1\_707-5p wykazała podwyższony poziom w liniach GBM, ale również w zdrowej nerce oraz raku jelita grubego. SNORA81 natomiast charakteryzowała się podwyższonym poziomem w liniach komórkowych nie-GBM w porównaniu z liniami GBM z wyjątkiem jej wysokiego poziomu w linii U-118 MG. Dodatkowo zaobserwowano również podwyższony poziom SNORA77 i SNORA81 w linii komórkowej U 87 MG. Ze względu na

wysoki poziom wszystkich badanych cząsteczek w liniach komórkowych U-118 MG oraz U-251 MG, szczególnie cząsteczek sdRNA, zostały one wybrane jako linie modelowe w dalszych badaniach.

Dalsze badania przeprowadzone przez doktorantkę, mgr Adrianę Grabowską to analiza wyników sekwencjonowania komórek z delecją genu FUS. Ponieważ wiadomo, że FUS zaangażowany jest w regulację ekspresji genów związanych z progresją nowotworu, można założyć, że ma to również związek z akumulacją kolistych cząsteczek RNA, jako produktów tak zwanego backsplicingu, czyli niepoprawnego procesu wycinania intronów przez spliceosom. Nie ulega jednak wątpliwości, że te interesujące obserwacje wymagają dalszych badań i analiz.

Badania ujawniły występowanie szeregu snoRNA o zróżnicowanym poziomie, a wykonana immunoprecypitacja tego białka potwierdziła jego wiązanie z cząsteczkami snoRNA, co potwierdza wcześniejsze doniesienia o jego wiązaniu z intronami. Przeprowadzono także analizę oddziaływania z białkami. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy doktorskiej zostały podsumowane i zebrane w Tabeli. Informacje w niej zawarte obejmują charakterystykę wybranych cząsteczek sdRNA (1\_707-5p, 1\_707-3p, hsa-miR-1248) oraz ich prekursorowych snoRNA (SNORA77, SNORA81), a także podsumowanie dotyczące korelacji wybranych cząsteczek, ich specyficzności występowania, lokalizacji, czy możliwości wiązania z wybranymi białkami. Wszystkie uzyskane wyniki zostały precyzyjnie omówione w rozdziale zatytułowanym Dyskusja. Ta ważna część dysertacji została oparta na znaczącej liczbie artykułów naukowych (pełna lista cytowanych w pracy mgr Adrianę Grabowską artykułów liczy 342 pozycje). Zarówno dobór prac użytych do przygotowania rozdziału Dyskusja, jak i sposób wykorzystania zawartych w nich informacji nie budzi moich zastrzeżeń. Część z zaprezentowanych danych ma charakter wyników wstępnych i wymaga dalszych badań. Doktorantka zdaje sobie z tego sprawę i podkreśla ten fakt po omówieniu wyników i przedstawieniu ich interpretacji. Pracę kończy rozdział Wnioski, który w punktach przedstawia uzyskane wyniki oraz ich znaczenie w zrozumieniu podstaw molekularnych procesów odpowiedzialnych za powstanie glejaka wielopostaciowego. Frakcjonowanie subkomórkowe wykazało, że badane cząsteczki sdRNA lokalizują się w jądrze i są związane z chromatyną, co ma związek z pełnioną przez nie funkcją, a także biogenezą sdRNA. Cząsteczka 1\_707-5p może brać udział w regulacji ekspresji genów poprzez wiązanie do chromatyny wraz z białkiem FUS. Cząsteczki SNORA77 i SNORA81 mogą wiązać się do chromatyny poprzez białko AGO2, wpływając na splicing. 5. SdRNA hsa-miR-1248 ulega podwyższeniu w populacji komórek macierzystych (GSC), a także może zmieniać lokalizację subkomórkową w zależności od stanu patologicznego. SdRNA hsa-miR-1248 może występować w populacji GSC znajdującej się w regionie okołonaczyniowym na obrzeżach guza, co sugeruje jej udział w progresji GBM. Cząsteczka ta może mieć cytoplazmatyczną lokalizację i pełnić rolę 148 w procesie interferencji RNA w zdrowych komórkach, natomiast po transformacji nowotworowej, cząsteczka ta może pełnić swoją funkcję w jądrze obniżając poziom genu docelowego poprzez nieznaną mechanizm. Czy na podstawie przeprowadzonych badań, doktorantka podjęłaby się próby wytypowania schematu działania takiego mechanizmu?? Badane sdRNA wykazują odmienne mechanizmy biogenezy.

### Uwagi końcowe:


Sugestie czy pytania dotyczące ocenianej rozprawy nie umniejszają w żaden sposób mojej wysokiej oceny pracy doktorskiej mgr Adrianie Grabowskiej.

W przedstawionej mi do oceny dysertacji zaprezentowano bardzo interesujące i oryginalne wyniki przeprowadzonych badań naukowych. Wszystkie wyniki zostały właściwie zinterpretowane i poddane właściwej konfrontacji z publikowanymi danymi pochodzącymi z artykułów, opublikowanych przez innych badaczy. Doktorantka nie zakończyła badań na etapie prezentowanych wyników, ale przedstawiła także perspektywy dalszych interesujących badań celem ulepszenia diagnostyki glejaka wielopostaciowego w korelacji z materiałem pochodzącym od zdrowego pacjenta, co świadczy zarówno o wysokiej jakości uzyskanych i przedstawionych w pracy danych, ale także podejściem naukowym doktorantki do prowadzonych badań.

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 mgr Adrianie Grabowskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Jednocześnie, z uwagi na wysoki poziom przedstawionych w pracy wyników, zastosowaniu szerokiej gamy metod badawczych a także rzetelne podejście naukowe do przedstawionej interpretacji wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr Adrianie Grabowskiej.

Katedra Biochemii Lekarskiej UJ CM



dr hab. Joanna Dulińska-Litewka, prof. UJ