

Katarzyna Rolle

Informacje o osiągnięciu i dorobku naukowym

Tytuł osiągnięcia naukowego

Nowe narzędzia diagnostyczne i terapeutyczne oparte o RNA w terapii guzów mózgu

AUTOREFERAT

a) **Imię i nazwisko:** KATARZYNA ROLLE

b) **Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy , miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej:**

- Magister biologii, specjalność: biologia eksperymentalna, Wydział Biologii im. A. Mickiewicza w Poznaniu, 2001, praca magisterska pt. "Wpływ wybranych hormonów miotropowych na pracę serca *Tenebrio molitor in vivo*". Promotor: prof. dr hab. Grzegorz Rosiński
- Doktor chemii w zakresie biochemii, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, 2006, praca doktorska pt. „Badanie struktury niekodujących RNA na przykładzie DsrA RNA z *Escherichia coli*”. Promotor: prof. dr hab. Mirosława Barciszewska

c) **Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:**

- 09-12. 2007 - Pracownia Biochemii tRNA, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, asystent;
- 01-05.2007 - Max Planck Institute for Infection Biology, Berlin, Niemcy, Max Planck Society, Max Planck Institute for Infection Biology, Berlin, Niemcy
- 2008-2015 - Zakład Biologii RNA, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, adiunkt.
- 2016-obecnie - Zakład Biologii Kwasów Nukleinowych, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, adiunkt.

d) **Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustaw z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):**

a) **Tytuł osiągnięcia naukowego**

Nowe narzędzia diagnostyczne i terapeutyczne oparte o RNA w terapii guzów mózgu

b) **Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego ze szczegółowym omówieniem indywidualnego wkładu wnioskodawcy:**

Osiągnięciem naukowym jest opracowanie nowych narzędzi diagnostycznych i terapeutycznych opartych o kwasy nukleinowe. Zostało ono opisane i przedstawione w monotematycznym zestawie 6 publikacji eksperymentalnych i 2 publikacji przeglądowych. Prace te zostały opublikowane w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Report. Łączny współczynnik oddziaływania (*impact factor*, IF) czasopism, w których ukazały się publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 25,36,

punkty MNiSW – 235, liczba cytowań wg bazy Web of Science (WoS) – 44. **Ważnym elementem osiągnięcia naukowego jest także artykuł monograficzny oraz patent amerykański**

1. Wyszko E, Rolle K, Nowak S, Zukiel R, Nowak M, Piestrzeniewicz R, Gawrońska I, Barciszewska MZ, Barciszewski J. 2008. *A multivariate analysis of patients with brain tumors treated with ATN-RNA*. Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research 65:677-84.
IF (2008)- 0,74 /pkt MNiSW- 15/ Cyt. WoS – 13
2. Rolle K, Nowak S, Wyszko E, Nowak M, Zukiel R, Piestrzeniewicz R, Gawronska I, Barciszewska MZ, Barciszewski J. 2010. *Promising human brain tumors therapy with interference RNA intervention (iRNAi)*. Cancer Biology and Therapy 9:396-406.
IF (2010)- 3,07 /pkt MNiSW- 30/ Cyt. WoS – 20.
3. Piwecka M, Rolle K, Wyszko E, Żukiel R, Nowak S, Barciszewska MZ, Barciszewski J. 2011. *Nucleic acid-based technologies in therapy of malignant gliomas*. Current Pharmaceutical Biotechnology 12:1805-22.
IF (2011)- 3,03 /pkt MNiSW- 30/ Cyt. WoS – 3.
4. Belter A*, Gudanis D*, Rolle K*, Piwecka M, Gdaniec Z, Barciszewska MZ, Barciszewski J. 2014. *Mature miRNAs form secondary structure, which suggests their function beyond RISC*. PLoS One Vol 9 issue 11; e113848.
IF (2014)- 3,23 /pkt MNiSW- 40/ Cyt. WoS – 5.
5. Piwecka M*, Rolle K*, Belter A, Barciszewska AM, Żywicki M, Michalak M, Nowak S, Naskręt-Barciszewska MZ, Barciszewski J. 2015. *Comprehensive analysis of microRNA expression profile in malignant glioma tissues*. Molecular Oncology 9:1324-40.
IF (2014)- 5,33 /pkt MNiSW- 40/ Cyt. WoS – 3.
6. Rolle K. 2015. *miRNA multiplayers in glioma. From bench to bedside*. Acta Biochimica Polonica Vol 62, issue: 3, 353-365.
IF (2014)- 1,15 /pkt MNiSW- 15/ Cyt. WoS – 0.
7. Rolle K*†, Piwecka M*, Belter A*, Wawrzyniak D, Jeleniewicz J, Barciszewska MZ, Barciszewski J. 2016. *The sequence and structure determine the function of mature human miRNAs*. PLoS One, Vol 11, issue 3; e0151246.
IF (2014)- 3,23 /pkt MNiSW- 40/ Cyt. WoS – 0.
8. Belter A*, Rolle K*, Piwecka M*, Fedoruk-Wyszomirska A, Naskręt-Barciszewska MZ, Barciszewski J. 2016. *Inhibition of miR-21 in glioma cells using catalytic nucleic acids*. Scientific Reports 15;6:24516.
IF (2014)- 5,58 /pkt MNiSW- 40/ Cyt. WoS – 0.

9. Rolle K, Nowak S, Wyszko E, Nowak M, Żukiel R, Piestrzeniewicz R, Gawronska I, Barciszewska MZ, Barciszewski J. 2009. *Interference RNA intervention in the brain tumors*. Therapeutic Ribonucleic Acids in Brain Tumors, eds. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp:221-253.
10. Barciszewski J, Barciszewska M, Rychlewski L, Wyszko E, Gawrońska I, Żukiel R, Rolle K, Nowak S. 2015. *Sequence of dsRNA: ATN-RNA specific for tenascin-C*. Numer patentu: 8946400. Zakres terytorialny ochrony patentowej: USA. Nazwa urzędu udzielającego patent: United States Patent and Trademark Office.

- * Autor równorzędny
- † Autor korespondencyjny

c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Nowe narzędzia diagnostyczne i terapeutyczne oparte o RNA w terapii guzów mózgu

Cel badań

Celem badań stanowiących rozprawę habilitacyjną było opracowanie i wykorzystanie kwasów nukleinowych jako narzędzi w potencjalnej diagnozie i terapii guzów mózgu. Niniejszymi badaniami objęłam różne klasy RNA:

- a) kodujące i niekodujące RNA (mRNA tenascyny-C oraz miRNA) jako cząsteczki docelowe w potencjalnej terapii;
- b) niekodujące RNA jako biomarkery w diagnostyce guzów mózgu (miRNA);
- c) dwuniciowy RNA (dsRNA) oraz katalityczne kwasy nukleinowe (rybozimy) jako specyficzne i efektywne narzędzia molekularne.

Realizacja powyższych zadań doprowadziła do:

- a) lepszego poznania molekularnych podstaw rozwoju glejaka wielopostaciowego poprzez identyfikację nowych cząsteczek miRNA zaangażowanych w ten proces,
- b) opracowania nowych, precyzyjnych i skutecznych narzędzi opartych o kwasy nukleinowe (ang. *RNA-based tools*),
- c) do zaprojektowania skutecznych i precyzyjnych narzędzi opartych o technologię kwasów nukleinowych.

Narzędzia te zostały przez nas po raz pierwszy wykorzystane w unikalnej, eksperymentalnej terapii guzów mózgu, która została zastrzeżona patentem amerykańskim., oraz zgłoszeniami patentowymi krajowymi i międzynarodowymi.

Wprowadzenie

Centralny dogmat biologii molekularnej zakłada, że przepływ informacji genetycznej w komórkach zachodzi kolejno z DNA przez RNA do białek. Sekwencje kodujące białka

stanowią około 1,5-2% genomu ludzkiego, ale pozostała część genomu w znacznej części również ulega transkrypcji [1-2]. Powstałe cząsteczki RNA (niekodujące RNA, ncRNA) są kluczowym elementem regulatorowym biorą udział w procesach komórkowych.

ncRNA stanowią grupę cząsteczek, które odgrywają zasadniczą rolę w rozwoju, funkcjonowaniu oraz stanach patologicznych, również w centralnym układzie nerwowym. O ogromnym potencjale regulatorowym opartym o RNA świadczyć może spektrum procesów, w które są one zaangażowane, a obejmujące m.in. zjawiska plastyczności synaptycznej, uczenia, pamięci i odpowiedzi na stres. Zaburzenia biosyntezy tych cząsteczek prowadzą do wielu schorzeń neurodegeneracyjnych, neurorozwojowych, neuropsychiatrycznych oraz nowotworowych [3]. Pomimo coraz bogatszej wiedzy na temat struktury ncRNA, ich genów i profili ekspresji w mózgu wciąż dalecy jesteśmy do pełnego zrozumienia molekularnych podstaw funkcjonowania centralnego układu nerwowego. Liczba genów ncRNA w genomach ssaków szacowana jest na co najmniej równą liczbie genów kodujących białka. Jest zatem oczywiste, że bez zrozumienia roli ncRNA nie będzie możliwe pełne poznanie złożonych procesów komórkowych. Pełniejszy obraz możliwości i potencjału ncRNA będzie możliwy po poznaniu nowych ncRNA i zbadaniu ich roli oraz mechanizmów kierujących ich działaniem. Określenie profilu ekspresji ncRNA, a przede wszystkim identyfikacja ncRNA specyficznych dla złośliwych guzów mózgu może stanowić niezwykle wartościowe narzędzie w diagnostyce medycznej. Charakterystyczny profil ekspresji ncRNA w pierwotnych guzach mózgu daje szansę na ocenę skuteczności leczenia oraz na wykorzystanie tego typu cząsteczek jako potencjalnych molekularnych markerów nowotworowych.

Jednym z ważniejszych ostatnich odkryć w biologii było zidentyfikowanie mikroRNA (miRNA) - klasy endogennych, niekodujących RNA o długości 19-25 nukleotydów, uczestniczących w post-transkrypcyjnej regulacji ekspresji genów. Funkcja miRNA związana jest z kontrolą wielu procesów biologicznych, na przykład: różnicowanie, proliferacja komórek, apoptoza, czy rozwój różnego typu chorób, w tym nowotworów [4-5].

Wiele dowodów wskazuje na to, że w kanonicznym szlaku biogenezy dojrzałe miRNA tworzą kompleksy z docelowym mRNA, głównie w nieulegającym translacji regionie przy końcu 3' (ang. 3' *untranslated region*, 3' *UTR*), modulując tym samym syntezę odpowiednich białek. Rozpoznawanie docelowej sekwencji w odpowiednim mRNA zależy głównie od krótkiej sekwencji źródłowej o niepełnej komplementarności do mRNA w rejonie od drugiego do ósmego nukleotydu na końcu 5' miRNA (ang. *seed sequence*) [6-8]. Chociaż większość badań wskazuje na udział miRNA w represji translacji (szczególnie na etapie inicjacji), niektóre doniesienia sugerują także, że miRNA może obniżać stabilność docelowego mRNA [9-14]. Ze względu na wciąż niepełne jeszcze zrozumienie mechanizmu działania miRNA, proces hamowania ekspresji białka jest ciągle nieprzewidywalny i często nie tak efektywny, jak się oczekuje. Ponieważ sekwencja źródłowa, która ostatecznie ma być decydująca dla obniżenia poziomu ekspresji białka, jest względnie krótka, nie zawsze obserwowany efekt działania jest wysoce specyficzny [15-16]. Dobrym tego przykładem są oddziaływania między jednym najlepiej poznanych - miR-21 i jego cząsteczką docelowej - białka PTEN. Analiza bioinformatyczna z użyciem jednego z powszechnie używanych programów TargetScan wskazuje, że komplementarność sekwencji pomiędzy tymi dwoma cząsteczkami

jest tak słaba, że nie przewiduje się nawet możliwości takiego oddziaływania. Z drugiej strony jednak, pomimo niskiego przewidywanego prawdopodobieństwa, takie oddziaływania bardzo często potwierdzone są eksperymentalnie jako funkcjonalne [17]. Wciąż nie jest jednak jasne, w jaki sposób krótka źródłowa sekwencja nukleotydowa może wykazywać specyfikę działania miRNA w skali genomowej, zwłaszcza że ta krótka prosta komplementarność pojedynczego miRNA sprawia, że może on regulować do tysięcy różnych cząsteczek docelowych [18-19].

Zaburzenia biogenezy miRNA oraz ich mutacje powodują poważne dysfunkcje komórek. Poznano ponad 290 chorób u podłoża, których leżą zmiany w profilu ekspresji miRNA. Największą grupę spośród nich stanowią choroby nowotworowe. Liczne doniesienia wykazują, że miRNA odgrywają kluczową rolę w tworzeniu masy nowotworu, angiogenezie, procesach inwazji i apoptozie w różnych typach nowotworów, w tym guzów mózgu [4-5]. Chociaż rola miRNA w patogenezie nowotworu jest oczywista, nadal jednak nie wiadomo, czy deregulacja poziomu ekspresji miRNA jest przyczyną czy skutkiem transformacji nowotworowej [20-21].

Odkrycie tysięcy różnych miRNA doprowadziło do nowego spojrzenia i zmian w naszym rozumieniu genetycznych mechanizmów kontrolnych. miRNA biorą bowiem udział w tworzeniu różnych fenotypów nowotworowych, ale ich funkcja w komórkach w różnych postaciach nowotworów nadal pozostaje słabo poznana [22]. Szacuje się, iż około 70% miRNA występuje w tkance nerwowej, a wśród tkankowo-specyficznych, ulegających nasilonej ekspresji miRNA ponad połowa pochodzi właśnie z tej tkanki [23-24]. Dlatego też miRNA, wydają się stanowić doskonały cel w terapii guzów mózgu.

Nowotworowe komórki glejowe mózgu dają początek guzom glejowym, z których najbardziej złośliwym, opornym na leczenie i źle rokującym jest glejak wielopostaciowy (ang. *glioblastoma multiforme*, GBM). Chociaż GBM rzadko dają przerzuty poza centralny układ nerwowy, są bardzo inwazyjne i niszczą przylegające tkanki, co utrudnia lub uniemożliwia całkowitą resekcję guza i przyczynia się do szybkiego postępu choroby, niskiej jakości życia oraz ostatecznie, bardzo wysokiej śmiertelności.

GBM jest najczęstszym pierwotnym nowotworem ośrodkowego układu nerwowego pochodzenia glejowego o najbardziej agresywnym przebiegu klinicznym i złym rokowaniu. Glejaki należą do guzów złośliwych (anaplastycznych) i obejmują astrocytoma (*Astrocytoma anaplasticum*, AA, stopień III), oligodendroglioma (AG, stopień III) oraz glejak wielopostaciowy (*glioblastoma multiforme*, GBM, stopień IV). Prognoza wynosi 2-3 lata dla AA, 8-12 miesięcy dla GBM, a w przypadku wznowy guza czas przeżycia wynosi około 2 miesięcy [25]. Do standardowych metod leczenia zaliczana jest resekcja, radioterapia, chemioterapia oraz terapia skojarzona. Glejaki złośliwe charakteryzują się niekontrolowaną proliferacją, inwazyjnością, powstawaniem ognisk martwicy, brakiem apoptozy i dynamiczną angiogenezą. Pomimo skojarzenia leczenia chirurgicznego z radio- i chemioterapią udaje się osiągnąć jedynie ograniczony sukces terapeutyczny wyrażony kilkumiesięcznym wydłużeniem okresu przeżycia pacjentów [25-26].

Badania profilu ekspresji genów w tkance glejaka wykazały znaczne różnice pomiędzy poszczególnymi typami guzów i pozwoliły wyodrębnić podtypy, które w tradycyjnych

metodach histopatologicznych nie są rozróżnialne. Na podstawie analizy zaburzeń w poziomie ekspresji genów takich jak *EGFR*, *NF1*, *PDGFR* i *IDH1* wydzielono cztery podtypy molekularne glejaków: proneuralny, mezenchymalny, klasyczny i neuralny. Wysokoprzepustowe analizy obejmujące wyniki profilu ekspresji miRNA, liczby kopii DNA oraz metylacji DNA wykazały jednak, iż wydzielenie podtypu guza w obrębie jednego stopnia histopatologicznego jest znacznie bardziej skomplikowane i nie może opierać się tylko na analizie genetycznej [27]. Analiza stopnia złośliwości guza mózgu w oparciu o profil ekspresji miRNA pozwoliła na zidentyfikowanie pięciu podtypów GBM (promienisty, glejowo-promienisty, oligoneuralny, mesenchymalny oraz astrocytarny). Tylko molekularne podtypy GBM oparte o analizę profilu miRNA silnie korelują ze stopniem złośliwości guza, wrażliwością na zastosowaną terapię oraz prognozowanym czasem życia pacjentów [27-29]. miRNA stanowią więc mogą nie tylko niezwykle użyteczny czynnik prognostyczny w terapii GBM, ale dodatkowo stanowią same w sobie doskonały cel terapeutyczny.

Brak wrażliwości glejaka wielopostaciowego na konwencjonalne metody leczenia, duża umieralność pacjentów oraz wyjątkowo skomplikowane podłoże molekularne tego nowotworu skłaniają ciągle do poszukiwania zarówno nowych cząsteczek terapeutycznych, jak również nowych metod terapii.

W rozwoju wielokomórkowego organizmu ważną rolę odgrywa macierz zewnątrzkomórkowa (ang. *extracellular matrix*, ECM). Nie tylko spaja ona komórki, ale poprzez różnorodne wzajemne oddziaływania kontroluje ich zachowanie i morfologię, jak również wpływa na wzrost i różnicowanie. Jednym z ważnych komponentów ECM jest grupa multimerów, glikozylowanych białek o nazwie tenascyny. Jednym z nich jest tenascyna-C (TN-C) [30]. U człowieka, tkanki guzów są głównym miejscem depozycji tenascyny-C. Poziom ekspresji TN-C skorelowany jest ze stopniem złośliwości nowotworów mózgu - im wyższy jest poziom akumulacji tego białka, tym wyższy stopień guza w skali WHO, a co za tym idzie mniejsze szanse pacjentów na wyleczenie. Zwiększona ekspresja TN-C w guzie wpływa na morfologię, przyspieszony wzrost i migrację komórek poprzez aktywację międzykomórkowych szlaków sygnalizacyjnych [30-32]. Ze względu na szeroki zakres funkcji jakie pełni to białko w procesie nowotworzenia, wybraliśmy je jako cel terapii eksperymentalnej w leczeniu glejaka wielopostaciowego u ludzi przy pomocy RNAi.

Badania zawarte w publikacjach, stanowiących osiągnięcie naukowe, zostały podzielone na dwie części:

- a) pierwszy etap obejmował wykorzystanie technologii interferencji RNA w celu obniżenia poziomu ekspresji tenascyny-C. W badaniach tych skupiłam się na wykazaniu efektywności działania dwuniciowego RNA w eksperymentalnej terapii guzów mózgu,
- b) w drugim etapie badań, w oparciu o kolekcję tkanek nowotworowych, udostępnionych przez Klinikę i Katedrę Neurochirurgii i Neurotraumatologii w Poznaniu, dokonałam identyfikacji miRNA zaangażowanych w procesy nowotworzenia oraz takich, które mogą odpowiadać za progresję guza mózgu. W oparciu o profil ekspresji miRNA, wyselekcjonowałam cząsteczki wykazujące najsilniejszą ekspresję w guzach i wskazałam je jako cząsteczki docelowe w terapii molekularnej. W ostatnim etapie, w

celu obniżenia poziomu onkogennych miRNA zaprojektowałam schemat postępowania obejmujący wykorzystanie katalitycznych kwasów nukleinowych-rybozymów jako nowych narzędzi w potencjalnej terapii guzów mózgu.

Opis osiągnięcia naukowego

1. Terapia guzów mózgu w oparciu o dwuniciowy RNA

Badania obejmujące zastosowanie dsRNA w celu obniżenia ekspresji tenascyny-C, a w następstwie wykorzystanie tego narzędzia w molekularnej, eksperymentalnej terapii guzów mózgu, zostały opublikowane we wskazanych poniżej pracach oraz patencie.

- Wyszko E, Rolle K, Nowak S, Żukiel R, Nowak M, Piestrzeniewicz R, Gawrońska I, Barciszewska MZ, Barciszewski J. 2008. *A multivariate analysis of patients with brain tumors treated with ATN-RNA*, Acta Pol Pharm 65:677-684.
- Rolle K, Nowak S, Wyszko E, Nowak M, Żukiel R, Piestrzeniewicz R, Gawronska I, Barciszewska MZ, Barciszewski J. 2010. *Promising human brain tumors therapy with interference RNA intervention (iRNAi)*, Cancer Biol Ther 9:396-406.
- Piwecka M, Rolle K, Wyszko E, Żukiel R, Nowak S, Barciszewska MZ, Barciszewski J. 2011. *Nucleic acid-based technologies in therapy of malignant gliomas*. Curr Pharm Biotechnol 12:1805-22.
- Rolle K, Nowak S, Wyszko E, Nowak M, Żukiel R, Piestrzeniewicz R, Gawronska I, Barciszewska MZ, Barciszewski J. 2009. *Interference RNA intervention in the brain tumors*. Therapeutic Ribonucleic Acids in Brain Tumors, eds. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp:221-253.
- Barciszewski J, Barciszewska M, Rychlewski L, Wyszko E, Gawrońska I, Żukiel R, Rolle K, Nowak S. 2015. *Sequence of dsRNA: ATN-RNA specific for tenascin-C*. Numer patentu: 8946400. Zakres terytorialny ochrony patentowej: USA. Nazwa urzędu udzielającego patent: United States Patent and Trademark Office.

We współpracy Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu oraz Kliniki Neurochirurgii i Neurotraumatologii UM w Poznaniu opracowaliśmy i wdrożyliśmy terapię eksperymentalną leczenia guzów mózgu. Polega ona na wprowadzeniu bezpośrednio do łoża pooperacyjnej dwuniciowego RNA (dsRNA) komplementarnego do mRNA białka macierzy pozakomórkowej - tenascyny-C (TN-C). Ten terapeutyczny czynnik nazwany ATN-RNA, indukuje naturalny proces wyciszania (interferencji RNA, RNAi) prowadząc do obniżenia ekspresji patologicznego białka.

Zaproponowana przez nas strategia terapeutyczna opiera się na długich (ok. 200 nukleotydowych) dwuniciowych cząsteczkach RNA (dsRNA) o sekwencji homologicznej do tenascyny-C (ang. *anti-tenascin RNA*, ATN-RNA), stanowiących substrat dla nukleazy Dicer hydrolizującej dsRNA do krótkich siRNA. Powodują one inhibicję ekspresji TN-C w komórkach guza mózgu i zahamowanie rozwoju nowotworu. Technologię tę nazwaliśmy **interwencją interferencyjnym RNA** (ang. *intervention with RNAi*, iRNAi). Terapia eksperymentalna leczenia guzów mózgu opierająca się o mechanizm interferencji RNA

(RNAi) jest pierwszym przypadkiem stosowania terapeutyków typu RNA bezpośrednio u ludzi. W pracy „*Promising human brain tumors therapy with interference RNA intervention (iRNAi)*”, pokazaliśmy, że zaprojektowany dsRNA jest dobrym substratem dla nukleazy Dicer i może być wykorzystany w naturalnym, komórkowym procesie interferencji RNA. Za pomocą specyficznego przeciwciała dla TN-C wykazałam, iż poziom ekspresji tenascyny-C spada o ok. 40 % w wyniku transfekcji linii komórkowej z użyciem ATN-RNA a ponadto, że poziom TN-C bezwzględnie związany jest ze stopniem złośliwości guza i wzrasta wraz ze stopniem jego złośliwości [33]. Dobór celu terapeutycznego podyktowany był szerokim przeglądem literatury w celu wyselekcjonowania cząsteczki przede wszystkim tkankowo-specyficznej oraz pełniącej w guzie mózgu wiele funkcji. Takim multifunkcyjnym białkiem biorącym udział w procesach takich jak: proliferacja, angiogeneza, mechanotransdukcja czy inwazja, okazała się być tenascyna-C. W opracowanym przez nas podejściu, chcieliśmy więc, uderzając w jeden cel molekularny, wpłynąć jednocześnie na kluczowe procesy w rozwoju nowotworu. Dotychczas wskazano na udział TN-C w rozwoju wielu typów nowotworów (np. piersi, jajnika, żołądka, prostaty), nigdy wcześniej nie wykazano jednak jej udziału w rozwoju guza mózgu [31-32]. Nasze prace dowiodły, iż TN-C nie tylko ulega ekspresji w guzie mózgu, ale jej ekspresja w tego typu tkance jest znacznie wyższa niż w przypadku innych nowotworów [34- publikacje z udziałem habilitantki zaznaczono pogrubionym drukiem].

Jako główny autor i wykonawca niniejszego projektu, każdorazowo przygotowywałam ATN-RNA oraz dostarczałam do Kliniki w celu podania preparatu podczas operacji neurochirurgicznej. Terapia eksperymentalna z zastosowaniem ATN-RNA objęła dotychczas 46 pacjentów ze zdiagnozowanym glejakiem wielopostaciowym (II - IV WHO). Ocena stanu neurologicznego po podaniu terapeutyku polegała na neuroobrazowaniu z użyciem rezonansu magnetycznego (ang. *magnetic resonance imaging*, MRI) oraz tomografii komputerowej (ang. *computer tomography*, CT). Dotychczasowe badania kliniczne wyraźnie wskazują na ograniczenie rozwoju guza w rejonie podania preparatu oraz na opóźnienie czasu wznowy. Resekcja guza połączona z aplikacją ATN-RNA wpływa także na poprawę parametrów jakości życia pacjenta ocenianą w skali KPS (ang. *Karnofsky Performance Scale*). Terapeutyczny efekt iRNAi został również poparty poprzez ocenę długości życia pacjentów. W porównaniu z danymi literaturowymi dotyczącymi pacjentów z GBM oraz z guzami WHOIII, dla których czas przeżycia wynosił średnio 48 tygodni po resekcji guza, zastosowanie ATN-RNA jest bardzo obiecujące. Średni czas przeżycia dla pacjentów poddanych iRNAi wynosi bowiem 106 tygodni, a może być wydłużony nawet do 120 tygodni, kiedy połączony jest dodatkowo z całkowitą resekcją guza [33].

Terapia eksperymentalna wykazała, iż tenascyna-C może być dobrym celem terapeutycznym ze względu na jej wysoką ekspresję w guzach mózgu oraz szeroki zakres funkcji pełnionych przez to białko w procesie nowotworzenia. Stwierdzono, że zastosowanie ATN-RNA wpływa na poprawę jakości życia pacjentów po resekcji guza mózgu oraz na wydłużenie czasu przeżycia. Podanie terapeutyku bezpośrednio do łoża pooperacyjnej inicjuje naturalny proces RNAi, czego efektem jest obserwowane ograniczenie ekspresji TN-C oraz poprawa jakości życia pacjentów. Należy jednocześnie podkreślić, iż w trakcie prowadzenia terapii u żadnego

z pacjentów nie zaobserwowano ubocznych skutków związanych z podaniem terapeutycznego, w tym także odpowiedzi interferonowej czy ubytków neurologicznych.

Terapeutyczny efekt dsRNA zależy od wielkości guza, możliwości jego resekcji, lokalizacji nowotworu oraz od wieku pacjenta. W pracy „*A multivariate analysis of patients treated with ATN-RNA*” zaprezentowaliśmy dokładną charakterystykę efektów zastosowania ATN-RNA w zależności od powyższych czynników [35].

Satysfakcjonujące wyniki badań z wykorzystaniem dsRNA stały się dla nas inspiracją i zachętą do poszukiwania nowych cząsteczek o potencjale terapeutycznym. W nurcie tych poszukiwań, stwierdziliśmy, iż w literaturze brakuje szerokiego przeglądu dotyczącego molekularnej terapii guzów mózgu. Dlatego też przygotowaliśmy publikację przeglądową „*Nucleic-acid-based technologies in therapy of malignant gliomas*” oraz monografię „*Interference RNA intervention in the brain tumors*” podsumowujące dotychczasową wiedzę na temat strategii terapeutycznych guzów mózgu, opisaliśmy badania eksperymentalne, jak i przedkliniczne, ale przede wszystkim, wskazaliśmy potencjał aplikacyjny kilku cząsteczek, nie podlegających dotąd zastosowaniom terapeutycznym (np. czynnik transkrypcyjny Gli1, surwiwina) oraz wykazaliśmy, iż narzędzia molekularne oparte o RNA, rzadko stosowane dotychczas w terapii guzów mogłyby być z powodzeniem użyte w podejściu obejmującym kilka cząsteczek docelowych (ang. *multitarget approach*) [36-37].

Osiągnięcia badawcze:

1. Wybór tenascyny-C jako celu terapeutycznego
2. Korelacja stopnia ekspresji tenascyny-C ze stopniem złośliwości nowotworu;
3. Opracowanie i wykorzystanie dsRNA do inhibicji ekspresji TN-C;
4. Zastosowanie dsRNA w terapii eksperymentalnej glejaka wielopostaciowego (poprawa jakości życia pacjentów, przedłużenie czasu przeżycia).

Możliwości praktycznego zastosowania

Praktyczne zastosowanie opracowanego narzędzia molekularnego opartego o RNA obejmuje terapię eksperymentalną pacjentów ze zdiagnozowanym glejakiem wielopostaciowym WHO IV. Prowadzona jest ona w oparciu o zgodę Komisji Bioetycznej UM w Poznaniu, a ATN-RNA stosowany jest jako uzupełnienie standardowych procedur medycznych. Sekwencja dsRNA, sposób przygotowania preparatu (formulacja) oraz podanie są chronione patentem amerykańskim, w którym jestem jednym z głównych autorów [38].

2. *miRNA w diagnostyce i terapii guzów mózgu*

Badania obejmujące identyfikację miRNA zaangażowanych w rozwój i progresję glejaka wielopostaciowego, wykorzystanie miRNA jako cząsteczek docelowych dla terapii molekularnej oraz zaprojektowanie i zastosowanie narzędzi opartych o RNA (katalityczne kwasy nukleinowe- rybozomy) do obniżenia poziomu onkogennych miRNA zostały zaprezentowane w poniższych pracach:

- Piwecka M, Rolle K, Belter A, Barciszewska AM, Żywicki M, Michalak M, Nowak S, Naskręt-Barciszewska MZ, Barciszewski J. 2015. *Comprehensive analysis of microRNA expression profile in malignant glioma tissues*. Mol Oncol. 9:1324-40.
- Belter A, Gudanis D, Rolle K, Piwecka M, Gdaniec Z, Barciszewska MZ, Barciszewski J. 2014. *Mature miRNAs form secondary structure, which suggests their function beyond RISC*. PLoS One, Vol. 9, issue 11; e113848.
- Rolle K. 2015. *miRNA multiplayers in glioma. From bench to bedside*. Acta Biochim Pol. Vol. 62, issue 3, 353-365.
- Rolle K, Piwecka M, Belter A, Wawrzyniak D, Jeleniewicz J, Barciszewska MZ, Barciszewski J. 2016. *The sequence and structure determine the function of mature human miRNAs*. PLoS One, Vol. 11, issue 3; e0151246.
- Belter A, Rolle K, Piwecka M, Fedoruk-Wyszomirska A, Naskręt-Barciszewska MZ, Barciszewski J. 2016. *Inhibition of miR-21 in glioma cells using catalytic nucleic acids*. Sci Rep. 15;6:24516.

W celu wykorzystania miRNA w celach aplikacyjnych, szczególnie istotne jest poznanie różnych aspektów ich oddziaływania. Dla zrozumienia ich funkcji miRNA ważna jest więc nie tylko identyfikacja docelowych cząsteczek mRNA czy badanie prekursorów miRNA. Ze względu na brak jasnych danych wskazujących na specyficzność działania miRNA, poza powszechnie przyjętym mechanizmem regulacji w oparciu o rejon źródłowy, uznaliśmy, iż klasa miRNA wymaga głębszej charakterystyki. Wydaje się, iż w takiej analizie bezwzględnie należy wziąć pod uwagę sekwencyjne i strukturalne aspekty funkcjonalnych dojrzałych cząsteczek miRNA.

Dla pełniejszego poznania i zrozumienia mechanizmów regulacji potranskrypcyjnej z udziałem miRNA wykonaliśmy szeroką i szczegółową analizę dojrzałych miRNA pod względem ich struktury I- i II-rzędowej, a wyniki badań opisaliśmy w pracy „*The sequence and structure determine the function of mature human miRNAs*” [39].

Na podstawie analizy składu nukleotydowego stwierdziliśmy, iż miRNA bogate są przede wszystkim w guanozynę i uracyl, który dodatkowo zajmuje zwykle pierwsze i ostatnie miejsce w łańcuchu nukleotydowym. Wykazaliśmy, iż trzy pierwsze nukleotydy przy końcu 5' miRNA to UAA, a rejon źródłowy (2-8nt) zaangażowany bezpośrednio w oddziaływanie z docelowym mRNA jest bogaty w uracyl i adeninę. Obecność termodynamicznie słabego oddziaływania pomiędzy miRNA a docelowym mRNA, sugerującym dodatkowe czynniki stabilizacyjne, co skłoniło nas do głębszej analizy sekwencji, a w konsekwencji struktury drugorzędowej dojrzałych miRNA.

W wyniku przeprowadzonej przez mnie szerokiej metaanalizy literatury, dotyczącej przede wszystkim funkcjonalnych aspektów obecności określonych motywów sekwencyjnych i strukturalnych, przeanalizowaliśmy wszystkie znane i dostępne w bazie danych miRBase dojrzałe ludzkie miRNA pod kątem obecności:

- a) motywu- UGUGU, znanego z wcześniejszych prac na temat siRNA ze zdolności aktywowania odpowiedzi interferonowej;
- b) powtórzeń GU, ze względu na znaczącą przewagę tych nukleotydów w składzie miRNA;
- c) zawartości puryn i pirymidyny.

Korzystając z metod bioinformatycznych, w oparciu o powyższe kryteria, zaproponowaliśmy listę 50 miRNA zawierających motyw indukcji interferonu, 23 miRNA bogate w powtórzenia GU (kryterium: 3 lub więcej powtórzeń) oraz 141 miRNA bogatych w puryny oraz 187 w pirymidyny.

Postawiłam sobie pytanie, czy sekwencja nukleotydowa i obecność określonych motywów, może wpływać na preferencje w oddziaływaniu z docelowym mRNA, a w następstwie, czy to oddziaływanie może przekładać się na udział miRNA w konkretnych szlakach komórkowych. Konsekwencją analizy sekwencji dojrzałych miRNA była obszerna charakterystyka szlaków, procesów biologicznych oraz białek związanych z poszczególnymi charakteryzowanymi miRNA. Wykazaliśmy, iż grupa miRNA charakteryzująca się obecnością motywu UGUGU aktywuje docelowe mRNA związane ze szlakami indukcji interferonu lub z procesami nowotworzenia. miRNA bogate w sekwencje powtórzone GU są zaangażowane z kolei głównie w procesy neurogenezy, podczas gdy miRNA obfitujące w puryny lub pirymidyny odpowiadają za regulację procesów transportu i/lub degradacji RNA. Wykazaliśmy zatem, iż istnieje bezpośrednia zależność pomiędzy sekwencją miRNA a rodzajem (typem) regulowanych przez nie docelowych mRNA. Taka charakterystyka dojrzałych miRNA może mieć kluczowe znaczenie dla wyboru cząsteczek o charakterze terapeutycznym oraz może wpłynąć na trafniejszą selekcję właściwej cząsteczki już na etapie projektowania strategii terapeutycznej.

W kolejnym etapie naszych badań, w pracy „*Mature miRNAs form secondary structure, which suggests their function beyond RISC*” przeanalizowaliśmy dojrzałe miRNA pod kątem ich zdolności do tworzenia struktur wyższego rzędu. Stwierdziliśmy, iż większość dojrzałych miRNA wykazuje potencjał do tworzenia stabilnych struktur typu spinka do włosów. W obrębie sekwencji dojrzałych miRNA znaleźliśmy motywy tetranukleotydowe o sekwencji GNRA lub UNCG, opisane wcześniej w literaturze, jako silnie wpływające na tworzenie struktury drugorzędowej typu spinka do włosów [39-40]. Na tej podstawie zaproponowaliśmy po raz pierwszy model struktury trzeciorzędowej dojrzałych miRNA w oparciu o modelowanie homologiczne ze strukturami wcześniej opisanymi i zweryfikowanymi eksperymentalnie [39-40]. W oparciu o analizę bioinformatyczną przeprowadziliśmy także eksperymentalne badanie struktury drugorzędowej wybranych miRNA [40]. Na podstawie metod z wykorzystaniem specyficznych rybonukleaz rozpoznających określone motywy strukturalne (RNAza V1, S1 oraz H) oraz metod jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR) i dichroizmu kołowego (CD) zaproponowano strukturę jednego z miRNA podlegających najsilniejszej ekspresji w guzach mózgu - miR21 oraz jego prekursora (pre-miR). Wykazaliśmy, iż dojrzała cząsteczka miR-21 przyjmuje strukturę spinki do włosów lub tworzyć może homodimer, co zależne jest od jej stężenia w komórce.

Ponieważ, głównym założeniem tej części moich badań, była identyfikacja miRNA zaangażowanych w rozwój guza mózgu, przeprowadziliśmy analizy wysokoprzepustowe, w wyniku których, określiliśmy profil ekspresji miRNA w guzach mózgu oraz wytypowaliśmy tzw. biomarkery miRNA [41].

Wyniki profilowania RNA z wykorzystaniem technik mikromacierzowych oraz wysokoprzepustowego sekwencjonowania (ang. *deep sequencing*), opublikowane w pracy „*Comprehensive analysis of miRNA expression profile in malignant glioma tissues*” pozwoliły na wyselekcjonowaliśmy cząsteczek miRNA zaangażowanych w rozwój glejaka wielopostaciowego. Wykazaliśmy, iż profil ekspresji miRNA w złośliwych guzach glejowych ulega znaczącym zmianom w porównaniu do zdrowej kontroli: znaleźliśmy 97 miRNA, których wzór ekspresji ulega zmianom - 76 miRNA ulega ekspresji wyłącznie w guzach mózgu, a 21- zarówno w guzach, jak i w obrzeżach guzów. Analiza ta wykazała jednocześnie, iż nie ma żadnej cząsteczki różnicującej obrzeże od guza, a tylko jedno miRNA ulega zróżnicowanej ekspresji w obrzeżu względem tkanki zdrowej. Obserwacja ta ma absolutne znaczenie w projektowaniu eksperymentów różnicujących profile ekspresji w tkance nowotworowej i niezmięnionej chorobowo. Badania te dowiodły, iż w przypadku guza mózgu, tkanka pozostająca w bezpośrednim sąsiedztwie guza glejowego nie może być traktowana jako tzw. „zdrowa kontrola”, ponieważ profil miRNA sugeruje jej znaczące podobieństwo względem tkanki nowotworowej [41].

Analiza miRNA uczestniczących w progresji nowotworu ze stopnia WHO III do WHO IV pozwoliła nam zidentyfikować 25 takich cząsteczek.

Jednocześnie wskazaliśmy 30 nowych biomarkerów miRNA dla GBM, które są obecnie weryfikowane w naszym laboratorium. Wstępna analiza funkcjonalna pokazała ich zaangażowanie w ważne ścieżki sygnałne przyczyniające się do kancerogenezy [dane niepublikowane].

Dodatkowo, przeprowadziłam meta-analizę dotyczącą badania profilu miRNA w tkankach pochodzących z guzów mózgu. W celu opracowania wyczerpującego obrazu profilu miRNA w guzach mózgu, wzięłam pod uwagę ilość analizowanych prób, rodzaj analizy (PCR w czasie rzeczywistym, sekwencjonowanie wysokoprzepustowe czy mikromacierze) oraz typ platformy do analiz (komercyjna czy projektowana na potrzeby eksperymentu). W swojej pracy skupiałam się wyłącznie na danych pochodzących z badania tkanki nowotworowej i pomimo, ogromnej ilości danych, nie analizowałam danych pochodzących z: linii komórkowych, komórek macierzystych glejaka, płynu mózgowo-rdzeniowego czy krwi obwodowej. Takie podejście pozwoliło nam na wskazanie najbardziej wyczerpującej listy 35 miRNA ulegających zróżnicowanej ekspresji w guzach mózgu.

Identyfikacja nowych biomarkerów w guzach mózgu dała podstawy do wskazania i wyboru nowych cząsteczek będących potencjalnymi celami terapeutycznymi. Wyniki profilowania skłoniły nas do wyboru kilku miRNA ulegających w GBM znacznie podniesionej ekspresji, a dodatkowa analiza składu nukleotydowego pozwoliła wybrać, najbardziej naszym zdaniem obiecujące, miRNA o charakterze terapeutycznym, jak: miR-93, miR-15b oraz miR-21 [41].

Ponieważ główne zadanie badawcze niniejszej części badań, oprócz identyfikacji nowych cząsteczek terapeutycznych, obejmowało także dobór odpowiedniego narzędzia molekularnego, w celu obniżenia poziomu ekspresji miRNA wybraliśmy katalityczne kwasy nukleinowe: rybozomy typu hammerhead (HH), od lat stosowane z powodzeniem w naszym laboratorium [42-43]. Cząsteczki te mają charakterystyczną budowę przypominającą głowę

młotka. Ich aktywność zależna jest od utworzenia specyficznej struktury, której krytycznym elementem jest trójnukleotydowa sekwencja (NUX), wyznaczająca miejsce hydrolizy zachodzącej przy 3' końcu niesparowanego nukleotydu [44]. Specyficzne wiązanie substratu następuje poprzez utworzenie dwuniciowych odcinków RNA między sekwencjami otaczającymi miejsce hydrolizy i rdzeń katalityczny. Powyższa cecha rybozymów powoduje, iż są one niezwykle skutecznym, ale przede wszystkim specyficznym narzędziem o potencjalnym znaczeniu terapeutycznym.

W podejściu zaproponowanym w realizowanym przez nasz Zespół grantie UDA-POIG.01.03.01-30-050-09 współfinansowanym ze środków Unii Europejskiej, którego byłam liderem, katalityczne kwasy nukleinowe zostały wykorzystane w sposób nowatorski. Nigdy wcześniej rybozomy nie były stosowane jako potencjalne terapeutyki w leczeniu guzów mózgu u ludzi, jak również, nigdy wcześniej cząsteczką docelową dla takiej terapii nie było miRNA.

W publikacji „*Inhibition of miR-21 in glioma cells using catalytic nucleic acids*”, skoncentrowaliśmy się na wykorzystaniu jako celu terapeutycznego miR-21, który w przeprowadzonym przez nas profilowaniu, wskazany został zarówno jako jeden z głównych czynników w rozwoju GBM, ale również jako wskaźnik progresji nowotworu. W oparciu o dane strukturalne zaprojektowaliśmy trzy rybozomy specyficzne względem sekwencji pre-miR21, z uwzględnieniem rybozemu komplementarnego względem sekwencji dojrzałego miR-21 [45].

W wyniku przeprowadzone analizy *in vitro*, zarówno oceny bezpośredniej hydrolizy, jak również w systemie reporterowym, wykazaliśmy, iż wszystkie trzy zastosowane rybozomy skutecznie obniżają poziom ekspresji miR-21. Najskuteczniejszym działającym rybozymem okazał się być jednak rybozym skierowany względem dojrzałej cząsteczki miR-21. Wyniki analizy *in vitro* zostały potwierdzone w linii komórkowej glejaka wielopostaciowego, gdzie na podstawie poziomu ekspresji zarówno pre-miR21, jak i miR-21 obserwowaliśmy głównie aktywność rybozemu specyficznego dla dojrzałego miR-21 [45].

Efektywność i specyficzność zaprojektowanych przez nas narzędzi zweryfikowaliśmy także na poziomie funkcjonalnym dla cząsteczek miRNA. Bezpośrednią cząsteczką docelową dla miR-21 jest m.in. supresorowe białko PTEN, którego ekspresja w komórkach nowotworowych ulega znaczącemu obniżeniu. W wyniku zastosowania rybozymów anti-miR21 obserwowaliśmy, zarówno obniżenie poziomu onkogennego miR-21, ale także, w przeprowadzonej przeze mnie analizie poziomu docelowego białka, oczekiwany i pożądaný efekt w postaci podniesienia poziomu białka PTEN [38]. Dane te pozwalają sądzić, iż wyselekcjonowane przez nas narzędzie może być skutecznym i bezpiecznym terapeutycznym stosowanym w leczeniu uzupełniającym guzów mózgu.

Osiągnięcia badawcze:

1. Wykazanie korelacji pomiędzy składem nukleotydowym dojrzałych miRNA a typem regulowanych przez nie docelowych cząsteczek mRNA oraz ich udziałem w określonych szlakach komórkowych,

2. Wskazanie możliwości tworzenia struktur drugorzędowych przez dojrzałe miRNA,
3. Określenie struktury drugorzędowej wybranych miRNA,
4. Identyfikacja potencjalnych biomarkerów miRNA glejaka wielopostaciowego metodami analiz wysokoprzepustowych,
5. Zastosowanie katalitycznych kwasów nukleinowych jako specyficznych i efektywnych narzędzi do obniżania poziomu ekspresji miRNA w guzach mózgu.

Możliwości praktycznego zastosowania

Wykorzystanie rybozymów do obniżenia poziomu ekspresji miR-21 w guzach mózgu zostało przez nas objęte krajowym i europejskim zgłoszeniem patentowym (P.403341 i PCT/IB2014/060188). Trwają prace zmierzające do wdrożenia terapii eksperymentalnej pacjentów ze zdiagnozowanym guzem mózgu, mającej na celu skojarzone działanie z wykorzystaniem dwóch cząsteczek terapeutycznych: tenascyny-C oraz miR-21.

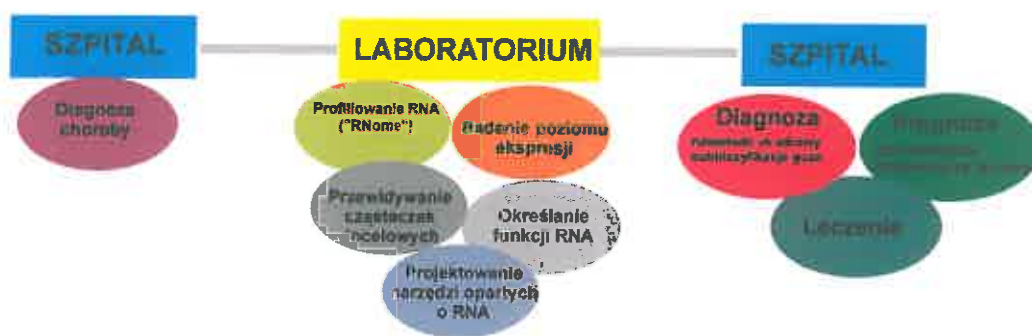
Podsumowanie

Głównym celem podjętych w ramach osiągnięcia habilitacyjnego działań zmierzających do terapii guzów mózgu, było doprowadzenia technik stosowanych w biologii molekularnej od diagnozy lekarskiej poprzez laboratorium i z powrotem do praktyki klinicznej. Takie działanie określone przeze mnie terminem „szpital-laboratorium-szpital” (ang. „*bedside to bench to bedside*”) (BBB)) objęło jasny wybór celu (jednostki chorobowej), cząsteczki docelowej, jak również odpowiednie narzędzie terapeutyczne. Kluczowe dla tego typu działań, było poszukiwanie nowych form leczenia i terapeutyków, które przy zahamowaniu wzrostu guza, nie obniżałyby jakości życia chorego. Odkrycie znaczenia biologicznego RNA, w tym głównie miRNA w komórkach glejaka pozwala nie tylko wypełnić luki pomiędzy wcześniej zidentyfikowanymi cząsteczkami, a procesami leżącymi u podstaw jego patogenezy, ale również stanowić może modelowy system, dzięki któremu rola RNA w nowotworzeniu i postępie choroby nowotworowej mogą być lepiej zrozumiane.

Badania profilowania ekspresji miRNA w guzach mózgu dowodzą, iż cząsteczki te biorą udział w progresji nowotworu, co w efekcie wpływa na ich wartość diagnostyczną lub prognostyczną i stanowi idealne wypełnienie schematu „szpital-laboratorium-szpital” (Rys. 1) [46]. W świetle niezadowolających wyników leczenia guzów mózgu, RNA, zarówno kodujące, jak i niekodujące mogą stać się doskonałymi cząsteczkami docelowymi w terapii tego typu nowotworów.

Badania przedstawione przeze mnie w ramach osiągnięcia habilitacyjnego wpisują się w przestrzeń, w której dokonuje się współpraca pomiędzy nauką a medycyną oraz zastosowanie znajdują zagadnienia terapii spersonalizowanej uznawanej za kluczowy priorytet opieki zdrowotnej w skali globalnej. Jest to jednocześnie przykład praktycznego wykorzystania osiągnięć medycyny translacyjnej czyli „tłumaczenia” języka nauki na praktykę kliniczną, a obejmującej m.in. rozwój nowych narzędzi czy leków, na podstawie analiz z wykorzystaniem tkanki nowotworowej (Rys.1- odcinek „szpital-laboratorium”. Wykorzystanie narzędzi biologii molekularnej, oceny biomarkerów molekularnych pozwala z

kolei m.in. identyfikować pacjentów, u których ryzyko wystąpienia danej choroby jest największe, a tym samym kształtować jej prognozę i terapię (Rys. 1 –odcinek „laboratorium-szpital”). Zastosowanie biomarkerów pozwala dokonywać również stratyfikacji pacjentów na tych, u których możemy spodziewać się pozytywnej odpowiedzi na terapię i tych, u których efekt terapeutyczny będzie znikomy lub nie pojawi się w ogóle.



Rys. 1. Potencjał kliniczny RNA.

Zgodnie ze stwierdzeniem F. Cricka „Chcesz poznać funkcję, poznaj najpierw strukturę”, wydaje się zatem, że tylko jednoczesne spojrzenie na obydwa aspekty badanych cząsteczek może dać wskazówki na temat projektowania innowacyjnych technologii terapeutycznych. Kluczowym dla wykorzystania RNA w potencjalnej terapii jest jednak zaprojektowanie specyficznych, skutecznych i bezpiecznych dla pacjenta narzędzi przynoszących pożądany efekt terapeutyczny. Takimi narzędziami mogą być niewątpliwie narzędzia oparte o RNA – dsRNA i technologia RNAi oraz katalityczne kwasy nukleinowe.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych i innych niewchodzących w skład osiągnięcia naukowego wymienionego w pkt. 3 oraz wskaźniki dokonań naukowych

a) Osiągnięcia naukowo-badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora

Jestem absolwentką Wydziału Biologii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu. Studia ukończyłam w maju 2001 roku uzyskując tytuł magistra biologii o specjalności biologia eksperymentalna. Pracę magisterską, pt. „Wpływ hormonów miotropowych na pracę serca poczwarek *Tenebrio molitor in vivo*” wykonałam w Zakładzie Fizjologii Zwierząt pod kierunkiem prof. dr hab. Grzegorza Rosińskiego. We wrześniu 2001 roku podjęłam studia doktoranckie w Zakładzie Biochemii tRNA Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu.

Tematem niekodujących, regulatorowych RNA stanowiący trzon mojego naukowego osiągnięcia habilitacyjnego zainteresowałam się już w trakcie pracy doktorskiej. W jej ramach prowadziłam badania dotyczące poznania i opisanie struktury drugorzędowej bakteryjnych niekodujących RNA, ze szczególnym uwzględnieniem DsrA RNA. W listopadzie 2006 roku obroniłam pracę doktorską, pt. „Badanie struktury niekodujących RNA na przykładzie DsrA RNA u *E. coli*” (promotor: prof. dr hab. M. Naskręt-Barciszewska). Wyniki uzyskane w trakcie realizacji pracy obejmujące zweryfikowany eksperymentalnie metodami biochemicznymi model struktury drugorzędowej DsrA RNA oraz jej oddziaływanie z białkiem Hfq zostały opublikowane [47]. Badania te uzyskały również finansowanie w ramach projektu promotorskiego (Analiza zmian strukturalnych niekodujących RNA na przykładzie DsrA RNA, 2PO4A04629, okres realizacji: 29.11.2005 – 28.05.2007).

Niekodujące regulatorowe RNA bakteryjne pełniące funkcję tzw. ryboprzełączników również znalazły się w kręgu moich zainteresowań badawczych, co zaowocowało pracą przeglądową [48].

W 2002 roku odbyłam staż naukowy w ramach stypendium FEBS Short-term Fellowship w Department of Human Retrovirology Academic Medical Center University of Amsterdam w Holandii. Mój pobyt w laboratorium kierowanym przez prof. B. Berkhouta związany był także z zagadnieniami biologii strukturalnej kwasów nukleinowych i obejmował oddziaływanie tRNA^{lys3} z regionem PAS RNA wirusa HIV-1 [49].

Moje obecne zainteresowania naukowe zostały zainicjowane pod koniec mojego doktoratu kiedy włączyłam się w nurt badań związany z badaniem funkcji białka macierzy zewnątrzkomórkowej- tenascyny C w guzach mózgu. Moje zaangażowanie w temat, który stał się wiodącym w mojej karierze naukowej, zaowocowało współautorstwem 2 prac eksperymentalnych oraz 3 prac przeglądowych o zasięgu krajowym [34, 50].

b) Tematyka badań realizowanych po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora, w styczniu 2007 roku rozpoczęłam roczny staż podoktorskie w Max Planck Institute for Infection Biology w Berlinie (Niemcy), finansowanego w ramach stypendium Max Planck Institute oraz EMBO Short-term Fellowship. Moje wcześniejsze zainteresowania związane z biologią strukturalną niekodujących RNA u bakterii zostały poszerzone o badanie funkcji RNA związanych z rozwojem patogenności szczepów bakterii chorobotwórczych, takich jak: *Salmonella typhimurium*, *Neisseria meningitidis* oraz *Lysteria monocytogenes*. W trakcie pobytu w laboratorium dr J. Vogla zdobyłam doświadczenie w badaniach poziomu ekspresji RNA oraz białek, ale przede wszystkim byłam zaangażowana w jeden z pierwszych na świecie projektów wykorzystujących technikę wysokoprzepustowego sekwencjonowania do profilowania ekspresji RNA, jak również kompleksów nukleoproteinowych (ang. *Co-IP deep seq*). Badania te zostały opublikowane w 2 pracach eksperymentalnych [50-51].

Po powrocie ze stażu podoktorskiego zdecydowałam się kontynuować i poszerzać badania związane z biologią nowotworów. W latach 2010-2011 podjęłam badania w ramach grantu MNiSW, w programie Iuventus Plus: *Opracowanie nowego terapeutyku opartego o interferencję RNA dla leczenia nowotworów człowieka* (IP2010 03517). Moje zainteresowania

skupiły się na wykorzystaniu technologii opartych o kwasy nukleinowe do wyciszenia cząsteczek odpowiedzialnych za rozwój nie tylko glejaka wielopostaciowego, ale również raka piersi i jajnika. W celu ograniczenia rozwoju nowotworu piersi i jajnika, w oparciu o wcześniejsze pozytywne rezultaty zastosowaliśmy dwuniciowy RNA do ograniczenia poziomu ekspresji tenascyny-C.

Poza głównymi zainteresowaniami, związanymi z ncRNA, włączyłam się także w rozwijający się w naszym laboratorium nurt badań dotyczący zastosowania związków niskocząsteczkowych w medycynie regeneracyjnej i kosmetologii. Efektem podjętych działań są przyznane w 2011 oraz 2013 roku patenty USA, dotyczące wykorzystania amidu kwasu 3-(p-hydroksyfenylo) propionowego oraz N-4-furfurylocytozyny w kompozycji antystarzeniowej (USA patent: 7923578 oraz 8404660).

Ze względu na aktywność antyproliferacyjną wybranych związków niskocząsteczkowych, w oparciu o zgodę Komisji Bioetycznej UM w Poznaniu podjęliśmy również próbę zastosowania ich w terapii eksperymentalnej glejaka wielopostaciowego. Badania długoterminowe, obejmujące obecnie grupę pacjentów liczącą ok. 100 osób są w toku. Jako koordynator powyższego projektu, przygotowuję obecnie zgłoszenie patentowe.

Poza głównym nurtem moich badań dotyczących biologii guzów mózgu, zaangażowałam się w projekt we współpracy z Institute de Biologie Moléculaire des Plantes CNRS, zespołem dr Andre Dietricha w Strasbourgu we Francji. Na badania te uzyskaliśmy finansowanie w postaci projektu NCN OPUS, którego jestem głównym wykonawcą (Rybozomy jako nowe narzędzia do badania genomu mitochondrialnego 2013/09/B/NZ1/03359).

Celem niniejszego projektu jest zastosowanie katalitycznych kwasów nukleinowych (rybozymów) jako specyficznych i skutecznych narzędzi molekularnych do wyciszania dowolnego genu w genomie mitochondrialnym. Po raz pierwszy stosujemy tego typu narzędzia w genomice funkcjonalnej mitochondriów i badamy efekt ograniczenia ekspresji, słabo dotychczas poznanych genów, takich jak gen maturazy roślinnej (*mat-R*) oraz *mttB*. Do celów projektu należy także zaliczyć szersze poznanie funkcji dwóch genów kodowanych przez mitochondrialne DNA. Przypuszcza się bowiem, iż analizowane geny są matrycą dla powstania białek istotnych w biogenezie kompleksów fosforylacji oksydacyjnej.

6. Podsumowanie dorobku naukowego

Mój dotychczasowy dorobek obejmuje łącznie 31 prac naukowych, w tym: 12 prac oryginalnych, 17 prac przeglądowych oraz 2 rozdziały w książce, z czego 8 prac zostało włączonych w osiągnięcie naukowe stanowiące rozprawę habilitacyjną. Ponadto jestem współautorem 9 komunikatów konferencyjnych oraz 3 patentów amerykańskich.

Dane bibliometryczne:

- Sumaryczny współczynnik oddziaływania IF według listy JCR zgodnie z rokiem opublikowania: 59,49 (w tym 11,6- komunikaty konferencyjne)
- Sumaryczna liczba punktów MNiSW: 465 (w tym 90 –komunikaty konferencyjne)
- Łączna liczba cytowań według bazy Web of Sciences: 442

- Indeks Hirscha według bazy Web of Sciences: 8

W ramach popularyzacji nauki brałam udział zarówno jako organizator i wykonawca w trzech wydarzeniach: Poznańskiej Nocy Naukowców (2009), Mediations Biennale Muzeum Narodowe w Poznaniu (2010) oraz Warsztatach „e-Szkoła –Moja Wielkopolska” (2012). Zostałam także zaproszona do wygłoszenia 8 wykładów w ramach m. in. konferencji „40th FEBS Congress”, „Modern Technologies in Neurosurgery”, „Wielkopolskich Dni Neurochirurgii”, „4. Światowego Tygodnia Mózgu” i „Dni Naukowca.

Praca w wielu projektach, zarówno w charakterze kierownika jak i wykonawcy projektu, zaowocowała rozwinięciem umiejętności organizacji pracy współpracujących zespołów badawczych, organizacji stanowiska pracy oraz umiejętnością zdobywania środków na badania.

Dotychczas kierowałam dwoma projektami badawczymi, finansowanymi przez NCN i MNiSW (JUVENTUS PLUS i projekt badawczy własny) oraz byłam liderem projektu finansowanego z funduszy POiG. Ponadto byłam lub jestem wykonawcą w 6 innych projektach badawczych oraz międzyuczelnianych ICHB-UM Poznań finansowanych przez NCBiR, MNiSW, NCN. Wykonałam również trzy recenzje dla czasopism naukowych o zasięgu międzynarodowym (*Cellular Physiology and Biochemistry* oraz *Acta Biochimica Polonica*) oraz projektu badawczego dla NCN (program Sonata).

W trakcie prowadzonych prac, w ramach dorobku dydaktycznego, sprawowałam opiekę merytoryczną nad czworgiem magistrantów oraz jedną pracą licencjacką w roli promotora, byłam opiekunem naukowym kolejnych czterech prac magisterskich oraz recenzentem jednej pracy licencjackiej. W ramach opieki nad doktorantami, pełniłam rolę promotora pomocniczego zakończonej już pracy doktorskiej (obrona 2015), sprawuję tę funkcję obecnie dla jednej pracy, a kolejnej jestem opiekunem naukowym.

Podczas swojej pracy naukowo-badawczej wraz z członkami zespołu otrzymałam Nagrodę Naukową Miasta Poznania (2008) za „Opracowanie, opublikowanie, opatentowanie i wdrożenie do praktyki klinicznej nowoczesnej metody guzów mózgu opartej o interferencję RNA”.

Literatura

1. Li GW, Xie XS (2011) Central dogma at the single-molecule level in living cells. *Nature* **475**:308-315.
2. Esteller M (2011) Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet* **12**:861-874.
3. Mehler MF, Mattick JS (2007) Noncoding RNAs and RNA editing in brain development, functional diversification, and neurological disease. *Physiol Rev* **87**:799-823.
4. Ambros V (2004) The functions of animal microRNAs. *Nature* **431**:350-355.
5. Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**:281-297.
6. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim VN (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**:415-419.
7. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U (2004) Nuclear export of microRNA precursors. *Science* **303**:95-98.
8. Bartel DP (2013) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**:215-233.

9. Ha I, Wightman B and Ruvkun G (1996) A bulged lin-4/lin-14 RNA duplex is sufficient for *Caenorhabditis elegans* lin-14 temporal gradient formation. *Genes Dev* 10:3041–3050.
10. Vella MC, Choi EY, Lin SY, Reinert K, Slack FJ (2004) The *C. elegans* microRNA let-7 binds to imperfect let-7 complementary sites from the lin-41 3'UTR. *Genes Dev* 18:132–137.
11. Rana TM (2007) Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:23–36.
12. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS and Bartel DP (2010) Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466:835–840.
13. Bazzini AA, Lee MT and Giraldez AJ (2012) Ribosome profiling shows that miR-430 reduces translation before causing mRNA decay in zebrafish. *Science* 336:233–237.
14. Janas MM and Novina CD (2012) Not lost in translation: stepwise regulation of microRNA targets. *EMBO J* 31:2446–2447.
15. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433:769–773.
16. Meijer HA, Kong YW, Lu WT, Wilczynska A, Spriggs RV, Robinson SW, Godfrey JD, Willis AE, Bushell M (2013) Translational repression and eIF4A2 activity are critical for microRNA-mediated gene regulation. *Science* 340:82–85.
17. Gao W, Xu J, Liu L, Shen H, Zeng H, Shu Y (2012) A systematic-analysis of predicted miR-21 targets identifies a signature for lung cancer. *Biomed Pharmacother.* 66:21–28.
18. Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP (2007) MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* 27:91–105.
19. Lee I, Ajay SS, Yook JI, Kim HS, Hong SH, Kim NH, Dhanasekaran SM, Chinnaiyan AM, Athey BD (2009) New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites. *Genome Res* 19:1175–1183.
20. Nicoloso MS, Spizzo R, Shimizu M, Rossi S, Calin GA (2009) MicroRNAs - the microsteering wheel of tumour metastases. *Nat Rev Cancer* 9:293–302.
21. Ventura A, Jacks T (2009) MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way. *Cell* 136:586–591.
22. Garzon R, Marcucci G, Croce CM (2010) Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat Rev Drug Discov* 9:775–789.
23. Cao X, Yeo G, Muotri AR, Kuwabara T, Gage FH (2006) Noncoding RNAs in the mammalian Central Nervous System. *Annu. Rev. Neurosci.* 29:77–103.
24. Konecna A, Heraud JE, Schoderboeck L, Raposo AA, Kiebler MA (2009) What are the roles of microRNAs at the mammalian synapse? *Neurosci Lett* 466:63–68.
25. Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK (2002) The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 61:215–225.
26. Koschny R, Koschny T, Froste UG, Krupp W, Zuber MA (2002) Comparative genomic hybridization in glioma: a meta-analysis of 509 cases. *Cancer Genet Cytogenet* 135:147–159.
27. Kim TM, Huang W, Park R, Park PJ, Johnson MD (2011) A developmental taxonomy of glioblastoma defined and maintained by microRNAs. *Cancer Res* 71:3387–3399.
28. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, Williams PM, Modrusan Z, Feuerstein BG, Aldape K (2006) Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 9:157–173.
29. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, Gupta S, Jakkula L, Feiler HS, Hodgson JG, James CD, Sarkaria JN, Brennan C, Kahn A, Spellman PT, Wilson RK, Speed TP, Gray JW, Meyerson M, Getz G, Perou CM, Hayes DN; Cancer Genome Atlas Research Network (2010) Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17:98–110.
30. Chiquet-Ehrismann (2004) Tenascins. *Int J Biochem Cell Biol* 36:986–990.

31. Chiquet-Ehrismann R, Tucker RP (2004) Connective tissues: signalling by tenascins. *Int J Biochem Cell Biol* 36:1085-1089.
32. Kim Ch.H., Bak KH, Kim YS, Kim JM, Ko Y, Oh SJ, Kim KM, Hong EK. (2000) Expression of tensin-C in astrocytic tumors: its relevance to proliferation and angiogenesis. *Surg Neurol* 54:235-240.
33. Rolle K, Nowak S, Wyszko E, Nowak M, Zukiel R, Piestrzeniewicz R, Gawronska I, Barciszewska MZ, Barciszewski J (2010) Promising human brain tumors therapy with interference RNA intervention (iRNAi). *Cancer Biol Ther* 9:396-406.
34. Pas J, Wyszko E, Rolle K, Rychlewski L, Nowak S, Zukiel R, Barciszewski J (2006) Analysis of the structure and function of tenascin-C, *Int J Biochem Cell Biol* 38:1594-1602.
35. Wyszko E, Rolle K, Nowak S, Zukiel R, Nowak M, Piestrzeniewicz R, Gawronska I, Barciszewska MZ, Barciszewski J (2008) *A multivariate analysis of patients with brain tumors treated with ATN-RNA*, *Acta Pol Pharm* 65:677-684.
36. Piwecka M, Rolle K, Wyszko E, Żukiel R, Nowak S, Barciszewska MZ, Barciszewski J (2011) *Nucleic acid-based technologies in therapy of malignant gliomas*. *Curr Pharm Biotechnol* 12:1805-1822.
37. Rolle K, Nowak S, Wyszko E, Nowak M, Zukiel R, Piestrzeniewicz R, Gawronska I, Barciszewska MZ, Barciszewski J (2009) *Interference RNA intervention in the brain tumors*. *Therapeutic Ribonucleic Acids in Brain Tumors*, eds. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp:221-253.
38. Barciszewski J, Barciszewska M, Rychlewski L, Wyszko E, Gawronska I, Żukiel R, Rolle K, Nowak S (2015) Sequence of dsRNA: ATN-RNA specific for tenascin-C. Patent number: 8946400. The territorial scope of patent protection: USA. Patent granted by the United States Patent and Trademark Office.
39. Rolle K, Piwecka M, Belter A, Wawrzyniak D, Jeleniewicz J, Barciszewska MZ, Barciszewski J (2016) The sequence and structure determine the function of mature human miRNAs. *PLoS One* 11(3):e0151246.
40. Belter A, Gudanis D, Rolle K, Piwecka M, Gdaniec Z, Barciszewska MZ, Barciszewski J (2014) Mature miRNAs form secondary structure, which suggests their function beyond RISC. *PLoS One* 9(11):e113848.
41. Piwecka M, Rolle K, Belter A, Barciszewska AM, Żywicki M, Michalak M, Nowak S, Naskręt-Barciszewska MZ, Barciszewski J (2015) Comprehensive analysis of microRNA expression profile in malignant glioma tissues. *Mol Oncol* 9:1324-1340.
42. Fedoruk-Wyszomirska A, Szymański M, Głodowicz P, Gabryelska M, Wyszko E, Estrin WJ, Barciszewski J (2015) Inhibition of HIV-1 gp41 expression with hammerhead ribozymes. *Biochem J* 471:53-66.
43. Wyszko E, Barciszewska MZ, Bald R, Erdmann VA, Barciszewski J (2001) The specific hydrolysis of HIV-1 TAR RNA element with the anti-TAR hammerhead ribozyme: structural and functional implications. *Int J Biol Macromol* 28:373-280.
44. Doherty EA, Doudna JA (2000) Ribozyme structures and mechanisms. *Annu Rev Biochem* 69:597-615.
45. Belter A, Rolle K, Piwecka M, Fedoruk-Wyszomirska A, Naskręt-Barciszewska MZ, Barciszewski J (2016) Inhibition of miR-21 in glioma cells using catalytic nucleic acids. *Sci Rep* 6:24516.
46. Rolle K (2015). *miRNA multiplayers in glioma. From bench to bedside*. *Acta Biochim Pol* 62(3):353-365.
47. Rolle K, Żywicki M, Wyszko E, Barciszewska MZ, Barciszewski J (2006) Evaluation of the dynamic structure of DsrA RNA from E.coli and its functional consequences, *J Biochem* 139:431-438.
48. Bugala K, Żywicki M, Wyszko E, Barciszewska MZ, Barciszewski J (2005) Riboswitches. *Postepy Biochem* 51:111-119.
49. Huthoff H, Bugala K, Barciszewski J, Berkhout, B (2003) On the importance of the Primer Activation Signal for initiation of tRNA^{lys}-primed reverse transcription of the HIV-1 RNA genome, *Nucleic Acids Res* 17:5186-5194.
50. Zukiel R, Nowak S, Wyszko E, Rolle K, Gawronska I, Barciszewska MZ, Barciszewski J (2006) Suppression of human brain tumor with interference RNA specific for tenascin-C, *Cancer Biol Ther* 5(8):1002-1007.
51. Sittka A, Lucchini S, Papenfort K, Sharma CM, Rolle K, Binnewies TT, Hinton JC, Vogel J (2008) Deep sequencing analysis of small noncoding RNA and mRNA targets of the global post-transcriptional regulator, Hfq. *PLoS Genet* 4:e1000163.

52. Sittka A, Sharma CM, Rolle K, Vogel J (2009) Deep sequencing of Salmonella RNA associated with heterologous Hfq proteins in vivo reveals small RNAs as a major target class and identifies RNA processing phenotypes. *RNA Biol* 6:266-275.

A handwritten signature in blue ink, reading "Kelyne Rolle". The signature is written in a cursive style with a long, sweeping underline for the first name.