



**Prof. dr hab. n. med. Ryszard Przewłocki
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk
Kraków**

Recenzja osiągnięcia naukowego zatytułowanego „Rozprawa o utraconym i przywróconym niekodującym RNA w ludzkich komórkach nowotworowych” oraz dorobku naukowego, dydaktycznego i organizacyjnego dr Jakuba Godlewskiego w związku z wnioskiem o nadanie stopnie doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Dane osobowe kandydata

Dr Jakub Godlewski ukończył studia biologiczne na Uniwersytecie Warszawskim. Na tym samym uniwersytecie w roku 2002 uzyskał stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii na podstawie pracy doktorskiej zatytułowanej „Analiza ekspresji genów kodujących białka zapasowe u diapauzujących larw *Galleria mellonella* (Lepidoptera)”. W latach 2010-2012 pracował na stanowisku asystenta w Stanowym Uniwersytecie Ohio w USA, a w latach 2012-2015 na stanowisku instruktora (*instructor*) w Brigham and Women’s Hospital w Harvard Medical School w Bostonie. Od roku 2015 do roku 2020 był zatrudniony na stanowisku adiunkta (*assistant professor*) w tej samej instytucji. Po powrocie do kraju w roku 2020 został zatrudniony w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie, gdzie pracuje do chwili obecnej na stanowisku kierownika Pracowni Neuroonkologii.



Ocena osiągnięcia naukowego

Przedłożone do oceny osiągnięcie naukowe zatytułowane „Rozprawa o utraconym i przywróconym niekodującym RNA w ludzkich komórkach nowotworowych” stanowi zbiór siedmiu powiązanych tematycznie oryginalnych publikacji, opublikowanych w latach 2008 - 2020. W skład cyklu wchodzi następujące prace:

1. Bronisz A, Rooj AK, Krawczyński K, Peruzzi P, Salińska E, Nakano I, Purow B, Chiocca EA, **Godlewski J***. The nuclear DICER-circular RNA complex drives the deregulation of the glioblastoma cell microRNAome. *Science Advances* 2020 Dec;6(51) doi: 10.1126/sciadv.abc0221. PMID: 33328224; IF2020: 14,134; MEiN /KBN: 200.
2. Rooj AK, Ricklefs F, Mineo M, Nakano I, Chiocca EA, Bronisz A, **Godlewski J***. MicroRNA-Mediated Dynamic Bidirectional Shift between the Subclasses of Glioblastoma Stem-like Cells. *Cell Reports* 2017 Jun 6;19(10):2026-2032. PMID: 28591575; IF2017: 8,032; MEiN /KBN: 40.
3. **Godlewski J***, Ferrer-Luna R, Rooj AK, Mineo M, Ricklefs F, Takeda YS, Nowicki MO, Salińska E, Nakano I, Lee H, Weissleder R, Beroukhim R, Chiocca EA, Bronisz A. MicroRNA Signatures and Molecular Subtypes of Glioblastoma: The Role of Extracellular Transfer. *Stem Cell Reports*. 2017 Jun 6;8(6):1497-1505. PMID: 28528698; IF2017: 6,537; MEiN /KBN: 40.
4. Ansari KI, Ogawa D, Rooj AK, Lawler SE, Krichevsky AM, Johnson MD, Chiocca EA, Bronisz A, Godlewski J*. Glucose-based regulation of miR-451/AMPK signaling depends on the OCT1 transcription factor. *Cell Reports* 2015 May 12;11(6):902-909. PMID: 25937278; IF2015: 7,870; MEiN /KBN: 40.
5. Peruzzi P, Bronisz A, Nowicki MO, Wang Y, Ogawa D, Price R, Nakano I, Kwon CH, Hayes J, Lawler SE, Ostrowski MC, Chiocca EA, **Godlewski J***. MicroRNA-128 coordinately targets Polycomb Repressor Complexes in glioma stem cells. *Neuro Oncology* 2013 Sep;15(9):1212-24. PMID: 23733246; IF2013: 5,286; MEiN /KBN: 45.
6. **Godlewski J**, Nowicki MO, Bronisz A, Nuovo G, Palatini J, De Lay M, Van Brocklyn J, Ostrowski MC, Chiocca EA, Lawler SE. MicroRNA-451 regulates LKB1/AMPK signaling and allows adaptation to metabolic stress in glioma *Molecular Cell* 2010 Mar 12;37(5):620-32. PMID: 20227367; IF2010: 14,194; MEiN /KBN: 32.



7. **Godlewski** J, Nowicki MO, Bronisz A, Williams S, Otsuki A, Nuovo G, Raychaudhury A, Newton HB, Chiocca EA, Lawler S. Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal. *Cancer Research* 2008 Nov 15;68(22):9125-30. PMID: 19010882. IF2008: 7,514; MEiN /KBN: 32.

W 3 pracach kandydat jest pierwszym autorem a w pięciu autorem korespondencyjnym (całkowity współczynnik wpływu zbioru prac wynosi 63,576). Analiza wkładu pracy kandydata w powstanie tego cyklu publikacji wskazuje na jego dominujący udział we wszystkich kolejnych etapach powstawania publikacji, a mianowicie w konceptualizacji, wykonaniu oraz w opracowaniu danych i przygotowaniu manuskryptów.

Finansowanie badań pochodziło w znakomitej większości z grantów uzyskanych w USA, w części z grantów przyznanych kandydatowi (stypendium podoktorskie z Fundacji Haydena, grant RO1 z Narodowego Instytutu Zdrowia (NIH) oraz Badań nad Rakiem (NCI), lub jego współpracownikom (praca 1 była finansowana w części przez grant NCN przyznany A.B.).

Dominującą tematyką prac dr Godlewskiego są badania nad poznaniem roli niekodujących ncRNA w transformacji nowotworowej, w szczególności dotyczą nowotworów pierwotnego guza mózgu ludzkiego glejaka. Istotne zagadnienie będące w obszarze zainteresowań habilitanta to procesy deregulacji występujących w glejaku transkryptów mikroRNA. Badania transkryptomu mikroRNA wykazały, że transkryptom komórki nowotworowej różni się znacznie od komórki nienowotworowej. W tkance ludzkiego glejaka oraz w komórkach glejaka hodowanych *in vitro* w porównaniu do tkanki zdrowej oraz odpowiednich komórek nienowotworowych znaczna pula mikroRNA ulega zahamowaniu. Ta obserwacja stała się jednym z istotnych czynników inspirujących badania dr Godlewskiego, szczególnie ze względu na brak wyjaśnienia mechanizmu tej regulacji, istotnej, jak się wydaje, dla procesu transformacji nowotworowej.



Początkowe badania tych zagadnień dotyczyły zmian poziomu ekspresji szeregu niekodujących mirRNA, w tym głównie mir-128 w tkance glejaka ludzkiego w porównaniu do ekspresji w kontrolnej tkance nerwowej. Badania te wykazały znaczny spadek ekspresji mir-128, oraz szeregu innych mirRNA w glejaku, a także pochodzących z ludzkiego złośliwego glejaka wielopostaciowego w liniach komórkowych U87 i U251. Kolejne badania *in vivo* przeprowadzone u myszy nagich (*nude*) wykazały, że wywołany komórkami U87 guz ze stabilną ekspresją mir-128 był znacznie mniejszy w porównaniu do myszy kontrolnych, a jego rozwój istotnie osłabiony.

Podsumowując, badania dr J. Godlewskiego prowadzące do wniosku, że poziom ekspresji mir-128 może być wczesnym objawem towarzyszącym glejakogenezie wykazują, że nasilona ekspresja mir-128 osłabia procesy nowotworzenia w testach *in vitro* oraz, że stabilna ekspresja mir-128 skutkuje osłabianiem regresji guza u myszy *in vivo* i zwiększa podatność komórek macierzystych glejaka na napromieniowanie. Ponadto, inne badania z udziałem dr J. Godlewskiego wykazały, że poziom mir-128 może być wczesnym biomarkerem glejakogenezy, a zmiany zależnego od mir-128 transkryptomu guza mogą być czynnikiem predykcyjnym skutecznego leczenia u pacjentów z glejakiem.

Przedstawione powyżej rezultaty badań stały się dla kandydata inspiracją do poszukiwań, molekularnych mechanizmów regulowanych przez mir-128. W kolejnych pracach wykazano, że mir-128 reguluje ekspresję białek Bmi1 oraz SUZ12, których podwyższony poziom występuje w glejaku, ale też w wielu rodzajach ludzkich nowotworów. Białka te należą do ważnych składników kompleksu represyjnego Polycomb-PRC1, który jest zaangażowany w modulowanie i wyciszenie niektórych obszarów chromatyny. Aktywność tego kompleksu jest wysoka w komórkach niezróżnicowanych, a jej osłabienie nasila różnicowanie. Ponadto, badania wykazały, że mir-128 reguluje również ekspresję genu kodującego białko Suz12, będącego składnikiem



drugiego kompleksu Polycomb-PRC2. Badania te wskazują, że mir-128 osłabia aktywności obu kompleksów PCR i w ten sposób wpływa na proces różnicowania.

Kolejnym celem szeregu badań prowadzonych przez dr J. Godlewskiego był mikroRNA-451. MikroRNA-451 okazał się wyjątkowy, ponieważ jest bezpośrednio związany z metabolizmem komórkowym. W tkankach nowotworowych, zarówno w badaniach na liniach komórek nowotworowych *in vitro*, jaki i w zwierzęcym modelu cukrzycy poziom mir-451 ulegał zmianom w sposób zależny od poziomu glukozy. Poziom mir-451 w komórkach glejaka wielopostaciowego pozostawał wysoki w środowisku bogatym w glukozę, a niski w stanach obniżenia jej poziomu. Wysoki poziom mir-451 wpływał na fenotyp komórek nowotworowych, ich ruchliwość w modelach komórkowych *in vitro* i inwazyjność *in vivo*. Ponadto, wykazano, że nasilona ekspresja mir-451 w komórkach nowotworowych czyni je bardziej podatne na radio- i chemioterapię. Badania dr J. Godlewskiego wskazują, że podniesiony poziom miR-451 hamuje rozwój i osłabia inwazyjność glejaka. To stwierdzenie może podlegać jednakże dyskusji, skoro inni autorzy wykazali, że podwyższony poziom miR-451 wiąże się z krótszym przeżyciem pacjentów z glioblastomą.

W kolejnych badaniach wykazano, że regulacja ekspresji miR-451 zależy od czynnika transkrypcyjnego OCT1. Ustalono mechanizm tej regulacji. Przy niskim poziomie glukozy aktywowany kompleks AMPK, zależny od kinazy LKB1, hamuje OCT1 co zapobiega aktywacji transkrypcji mir-451. Przy wysokim poziomie glukozy dochodzi do aktywacji OCT i wzrostu poziomu mir-451. Prace dr. J. Godlewskiego sugerują, że oddziaływanie AMPK, OCT1 i mir-451 stanowi pętlę pozwalającą na dostosowywanie się guza do środowiska, a przerwanie tej pętli oddziaływania osłabia inwazyjność nowotworu i odporność na terapię.



Wcześniejsze badania kandydata sugerowały, że w tkankach i liniach komórek glejaka poziom szeregu mirRNA jest obniżony. Jego kolejne badania dotyczą więc poznania pełnego profilu transkrypcyjnego mikroRNA glejaka, w szczególności jego charakterystyki w subpopulacjach komórek glejaka ludzkiego. Badania prowadzono *in vitro* na komórkach CSC pochodzących z różnych tkanek glejaka wielopostaciowego. Wykazały one, że istotnie poziom większości dojrzałych mikroRNA był znacznie obniżony. Ponieważ proces dojrzewania mikroRNA nie wydawał się być zmieniony, wyniki kolejnych badań sugerowały, że może to wynikać z lokalizacji endorybonukleazy DICER. Wykazano bowiem, że enzym ten w komórkach glejaka występuje głównie w jądrach komórkowych, a nie w cytozolu, gdzie w warunkach kontrolnych DICER generuje szereg mikroRNA z pre-mikroRNA. Ten fakt, jak wskazał kandydat, może być przyczyną spadku wytwarzania a tym samym poziomu większości mikroRNA. Kolejne badania sugerowały, że białkiem oddziaływującym z DICERem w jądrze komórkowym może być tzw. „białko zimnego szoku” RBM3. Poziom RBM3 jest znacznie podniesiony w komórkach glejaka, ale też, jak pokazały prace innych autorów, w szeregu innych nowotworów. Dr J. Godlewski wykazał, że w komórkach glejaka białko RBM3, które występuje wyłącznie w jądrze komórkowym, jest istotnym kandydatem interakcji z DICERem. Oddziaływanie pomiędzy DICEREM i RBM3 wydaje się skutkować zatrzymaniem endorybonukleazy w jądrze komórkowym i spadkiem jej poziomu w cytozolu. To w rezultacie prowadzi do spadku poziomu szeregu mikroRNA.

Kolejne analizy dotyczyły poszukiwania, obok białek, transkryptów RNA, potencjalnie oddziaływujących z DICERem w jądrze komórkowym. Wykazały one takie oddziaływanie z fragmentem znanego markera nowotworowego, niekodującego lncRNA MALAT1. W dalszych badaniach postawiono hipotezę, że ten fragment może być pochodzącym z MALAT1 cyrkularnym RNA i potwierdzono to przypuszczenie. Te badania doprowadziły do



wykrycia nowej kolistej formy fragmentu powstałego z MALAT, którą nazwano *circ2082*.

Dalsze prace skoncentrowały się na syntezie antysensownego inhibitora *circ2082* i na próbach zastosowania go w hodowlach komórek nowotworowych glejaka *in vitro* oraz w nadaniach *in vivo* u myszy atymicznych. Wykazano, że podanie tego inhibitora przywróciło powstawanie szeregu hamujących rozwój nowotworów mikroRNA, takich jak mir-128, mir-124 i mir-1, ale także hamowało nasiloną ekspresję znanych mikroRNA zaangażowanych w onkogenezę, mir-21 i mir-10b. Działanie inhibitora *circ2082* skutkowało istotnym osłabieniem onkogenezy komórek CSG glejaka *in vitro*, oraz zmniejszeniem powstającego guza w mysich modelach *in vivo*. To jest niewątpliwie ciekawa obserwacja, która może być inspiracją do poszukiwania innych, potencjalnych celów terapeutycznych, wśród niekodujących oraz cyrkularnych RNA. Interakcje cyrkularnych RNA z różnymi mikroRNA wydają się być istotne nie tylko w patologii ośrodkowego układu nerwowego, jakimi są nowotwory mózgu. Dlatego też uważam te odkrycia kandydata za szczególnie interesujące.

Przedstawiony do oceny materiał badawczy opublikowany w 7 oryginalnych pracach stanowi zwarty tematycznie i logicznie zbiór zagadnień i hipotez opartych o uzyskane wyniki. Prace cechuje opracowanie i zastosowanie nowoczesnych metodologii badawczych; różnych kultur komórkowych *in vitro*, modeli choroby nowotworowej u myszy *in vivo*, nowoczesnych technik transkryptomicznych, immunohistochemicznych i różnych metod badania białek. Kandydatowi udało się uzyskać oryginalne wyniki badań oraz doprowadzić drogą szeregu hipotez i wynikających z nich poszukiwań do interesujących rezultatów. Jednym z ważnych osiągnięć jest identyfikacja cyrkularnego RNA, który, jak wskazują przedstawione wyniki badań, może być krytycznym czynnikiem modyfikującym biosyntezę szeregu mikroRNA. Podsumowując, ocena przedstawionych prac i kierunków badawczych jest pozytywna. Rezultaty badań przyczyniły się do poszerzenia naszej wiedzy



na temat biologii molekularnej glejaka, mechanizmów zaangażowanych w jego powstawanie i rozwój. Udało się wskazać i zastosować oryginalne drogi terapii glejaka w modelach eksperymentalnych. Zgromadzona wiedza ta pozwala więc na rozwój racjonalnych dróg kontroli rozwoju glejaka jak i sugeruje potencjalne możliwości terapii. Te osiągnięcia stwarzają też nadzieję na rozwój przyszłych nowych terapii tego nowotworu u człowieka. Badania mają więc szeroki potencjał translacyjny. Dane przedstawione przez kandydata mogą też inspirować do podobnych poszukiwań w obszarze innych nowotworów.

Reasumując, moja opinia o badaniach wchodzących w skład dzieła habilitacyjnego jest pozytywna i stwierdzam, że przedstawiony do oceny zespół prac i wyniki badań spełniają wymagania osiągnięcia habilitacyjnego.

Ocena pozostałej aktywności naukowo-badawczej kandydata

Dr Jakub Godlewski jest autorem 44 publikacji oryginalnych (w tym 3 prace przed uzyskaniem stopnia doktora) oraz 4 prac przeglądowych, opublikowanych z Listy Filadelfijskiej. Dorobek kandydata uzyskany po doktoracie, tematyka i obszar zainteresowań jest konsekwentny i skoncentrowany na roli niekodujących RNA w regulacji zaburzonej homeostazy komórkowej, rozwoju i potencjalnych terapii glejaka wielopostaciowego.

Łączny współczynnik wpływu wynosi 320,23 (liczba punktów MNiSW=2333). Zbiorcza liczba cytowań bez autocytowań (Web. of Sci.) ma wartość 4105. Indeks Hirscha dr J. Godlewskiego wynosi 30. Kandydat posiada także jeden patent uzyskany w roku 2020. Dane naukometryczne wskazują na nieprzeciętny dorobek naukowy kandydata.

Wyniki badań dr J. Godlewskiego były prezentowane na ponad 30 zjazdach międzynarodowych. W latach 2016 - 2021 dr Godlewski wygłosił 14 wykładów na zaproszenie prestiżowych instytucji naukowych (w tym dwa w



Polsce w Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego oraz m.in. Harvard Medical School oraz Massachusetts General Hospital w Bostonie, Michigan State University i Australian National University w Canberze). Był też recenzentem wielu prac w prestiżowych czasopismach naukowych oraz 10 grantów międzynarodowych. Dane te wskazują na uznanie jego badań w międzynarodowym jak i krajowym świecie naukowym. Bardzo wysoko oceniam zaangażowanie dr J. Godlewskiego w pozyskiwanie funduszy grantowych przeznaczonych na wykonanie prowadzonych przez niego projektów naukowych. Dr Jakub Godlewski zrealizował dwa granty Narodowego Instytutu Zdrowia w USA, a aktualnie jest kierownikiem pięciu realizowanych grantów krajowych, w tym 2 grantów NCN.

Ocena aktywności dydaktycznej i organizacyjnej

Trudno jest ocenić precyzyjnie działalność dydaktyczną habilitanta oraz działalność w zakresie popularyzacji nauki w oparciu o przedstawione do oceny materiały. Przez szereg lat kandydat pracował w USA na różnych pozycjach, w tym na pozycjach „*assistant profesor*” oraz „*instructor*”. Należy więc sądzić, że z tymi stanowiskami było związane zaangażowanie kandydata w regularną działalność dydaktyczną i zajęcia ze studentami. Jednak takie informacje nie zostały przedstawione w Autoreferacie. Kandydat przedstawił natomiast przykłady opieki nad pracownikami naukowymi w IMDiK; (jednym magistrantem, dwoma doktorantami i jednym post-dokiem) oraz siedmioma post-dokami w różnych instytucjach w USA. Od roku 2021 dr Godlewski jest opiekunem grantu NCN PRELUDIUM, co z pewnością łączy się z obowiązkami dydaktycznymi. Kandydat był zaangażowany w organizację dwóch zjazdów międzynarodowych Stowarzyszenia Neuroonkologii, w których uczestniczył w latach 2017 oraz 2020 jako recenzent, jak należy sądzić, zgłaszanych materiałów konferencyjnych.

Wniosek końcowy



Stwierdzam, że dorobek dr Jakuba Godlewskiego uzyskany po otrzymaniu stopnia naukowego doktora, spełnia kryteria zdefiniowane w art. 219 Ustawy „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” z dn. 20 lipca 2018 roku. Dr Jakub Godlewski zgromadził bardzo wartościowy dorobek naukowy a przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe stanowi znaczący wkład kandydata w rozwój wiedzy o roli niekodujących RNA i ich udziale w procesach biorących udział w patologii glejaka wielopostaciowego. Wniosek o przyznanie dr Jakubowi Godlewskiemu stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne uważam za uzasadniony.

Prof. dr hab. n. med. Ryszard Przewłocki

Kraków, 15-05-2023

Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja PAN w Krakowie