



Warszawa, dn. 25.09.2024

RECENZJA
ROZPRAWY DOKTORSKIEJ GABRIELI BARSZCZEWSKIEJ-PIETRASZEK

**PT. „POLIMERAZA DNA THETA JAKO NOWY CEL
W SPERSONALIZOWANEJ TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ,
NA PRZYKŁADZIE NOWOTWORÓW MÓZGU I SKÓRY”**

Do oceny przedstawiono rozprawę doktorską wykonaną przez mgr Gabrielę Barszczewską-Pietraszek w ramach studiów doktoranckich prowadzonych w Stacjonarnym Studium Doktoranckim Genetyki Molekularnej, Cytogenetyki i Biofizyki Medycznej w Katedrze Genetyki Molekularnej Instytutu Biochemii na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego.

Promotorem rozprawy jest Pan prof. dr hab. Tomasz Śliwiński z Katedry Genetyki Molekularnej, Instytutu Biochemii, Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki. Promotorem pomocniczym w przewodzie jest Pan dr n. biol. Piotr Czarny z Zakładu Biochemii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Badania były finansowane ze środków grantu Narodowego Centrum Nauki (program OPUS 19), którego kierownikiem jest Promotor, oraz realizowane we współpracy z zewnętrznymi jednostkami, w tym z Uniwersytetem Temple w Stanach Zjednoczonych oraz Uniwersytetem Medycznym w Łodzi.

Rozprawę stanowią 3 manuskrypty (dwa opublikowane) uzupełnione blisko 30-stronnicowym opisem w języku polskim, zawierającym: informację o dorobku Kandydatki i współpracach, wstęp, cel, metodologię, wyniki i ich omówienie, wnioski, literaturę oraz streszczenia. Publikacje będące podstawą rozprawy doktorskiej stanowią prace:

(i) pogładowa, „Polθ Inhibition: An Anticancer Therapy for HR-Deficient Tumours” opublikowana w *International Journal of Molecular Sciences* w 2022 r. o wskaźnikach: IF - 5.6; MEiN - 140 pkt;

(ii) doświadczalna, „Polθ inhibitor (ART558) demonstrates synthetic lethal effect with PARP and RAD52 inhibitors in glioblastoma cells” opublikowana w *International Journal of Molecular Sciences* w 2024 r. o wskaźnikach: IF - 4.9; punkty MNiSW - 140 pkt;

(iii) doświadczalna, „Polθ inhibition with simultaneous treatment with PARP or RAD52 inhibitors induces cyto- and geno-toxic effect in melanoma cells and reduces tumor growth of human melanoma xenograft”. Zgodnie z informacją manuskrypt został złożony do czasopisma *Molecular Cancer Therapeutics, American Association for Cancer Research* o wskaźnikach IF - 5.4; punkty



MNiSW - 140 pkt.

We wszystkich tych publikacjach Kandydatka jest pierwszym autorem, a dodatkowo wiodący udział Doktorantki w powstaniu tych prac został potwierdzony przez współautorów w załączonych oświadczeniach.

Ocena rozprawy

Choroby nowotworowe stanowią istotną przyczynę zgonów. Zgodnie z danymi brytyjskich naukowców w grupie osób urodzonych po 1966 r. choroby nowotworowe zostaną zdiagnozowane u co drugiej osoby. Dlatego niezbędne jest poszukiwanie nowych markerów oraz molekularnych celów terapeutycznych, czemu m.in. służy lepsze poznanie molekularnego podłoża procesów związanych z kancerogenezą. Doktorantka wychodzi naprzeciw tym potrzebom podejmując się analizy znaczenia polimerazy DNA theta ($\text{Pol}\theta$) jako potencjalnego celu terapeutycznego. Replikazy DNA są unikalną grupą białek zdolnych do syntezy DNA. U bakterii to tylko 5 białek, zaś u człowieka grupę tę stanowi już kilkanaście enzymów. Są to enzymy o bardzo wysokiej wierności i procesywności, ale niektóre z nich wyróżniają się bardzo niską zdolnością do niepopelniania błędów w trakcie syntezy. Polimerazy cechujące się właśnie obniżoną wiernością jak i procesywnością stanowią grupę Y replikaz. Ich zadaniem jest m.in. synteza przez uszkodzenia, nawet kosztem popełnianych błędów. Do tej grupy należą dobrze już zbadane polimerazy prokariotyczne PolIV i PolV. Podobne cechy wykazuje wciąż enigmatyczna ludzka $\text{Pol}\theta$, będąca przedmiotem badań Doktorantki. $\text{Pol}\theta$ jest kodowana przez gen POLQ i wykazuje zdolność do replikacji przez uszkodzenia w sekwencji matrycowego DNA. $\text{Pol}\theta$ jest wiązana z procesami naprawy DNA, w tym z jednym z alternatywnych szlaków naprawy dwuniciowych pęknięć DNA. Co istotne, zwiększona ekspresja POLQ jest obserwowana w wybranych guzach i koreluje z gorszym rokowaniem.

Załączone do oceny manuskrypty zostały opatrzone wyczerpującym opisem w języku polskim i podzielone na sekcje typowe dla prac doktorskich. We wstępie, w sposób syntetyczny i wyczerpujący, Doktorantka przedstawiła obecny stan wiedzy na temat $\text{Pol}\theta$ i alternatywnych szlaków naprawy dwuniciowych pęknięć DNA oraz wybranych/badanych składowych systemów naprawy DNA. Odniosła się do najnowszych licznych danych literaturowych. Pierwszą z załączonych prac z cyklu należy również potraktować jako kompendium wiedzy na temat roli $\text{Pol}\theta$ w biologii komórki, ze szczególnym naciskiem na jej rolę w alternatywnym szlaku naprawy dwuniciowych pęknięć DNA (TMEJ). Dodatkowo, bardzo skrupulatnie opisała metody supresji $\text{Pol}\theta$ z użyciem siRNA, technologii CRISPR, czy inhibitorów. Praca powstała 2-3 lata temu



i utwierdza, że Doktorantka była doskonale przygotowana do realizacji zadań badawczych jakie sobie postawiła i realizowała w trakcie przewodu.

Cel pracy został jasno zdefiniowany. W swoich badaniach Doktorantka podjęła się analizy wpływu zablokowania aktywności Pol θ na biologię komórek rakowych. Badania rozszerzyła o analizy, w których dodatkowo hamowała aktywność innych kluczowych białek zaangażowanych w proces naprawy DNA (PARP1 lub RAD52) oraz traktowała komórki temozolomidem i dekarbazyną, chemioterapeutykami alkilującymi. Białko PARP1 (polimeraza poli(ADP-rybozy)) odgrywa istotną rolę m.in. w sygnalizacji komórkowej, naprawie DNA i utrzymaniu stabilności genomu. Białko Rad52 jest kluczowym molekularnym komponentem rekombinacji homologicznej, a ostatnie doniesienia wskazują na jego istotną rolę w biologii, zwłaszcza żywotności komórek nowotworowych. Kandydatka poszukiwała układu, w którym jednoczesne zahamowanie aktywności Pol θ oraz białek PARP1 lub RAD52 i traktowanie chemioterapeutykami wywoła efekt syntetycznej letalności komórek guza.

Materiały i metody, zarówno w opisie skróconym, jak i w każdym z oryginalnych manuskryptów, zostały opisane jasno i szczegółowo. Doktorantka posłużyła się w swoich badaniach wachlarzem zaawansowanych technik molekularnych, w tym cytometrią przepływową, testem kometowym, mikroskopią fluorescencyjną i innymi. W eksperymentach zastosowała linie komórkowe wyprowadzone z guzów litych mózgu i skóry oraz model zwierzęcy. Jako kontrole dobrała komercyjnie dostępne komórki prawidłowe wyprowadzone z astrocytów i melanocytów. Na badania uzyskała zgodę odpowiedniej Komisji Bioetycznej. Do analiz i wizualizacji wyników w postaci wykresów Kandydatka użyła odpowiednich testów statystycznych oraz oprogramowania.

W pierwszej z publikacji oryginalnych publikacji Kandydatka przedstawiła badania z użyciem komórek glejaka, natomiast w drugim z załączonych manuskryptów opisuje dane otrzymane z prac z użyciem komórek czerniaka. Osobiście uważam, że najcenniejszą obserwację dostarczyły doświadczenia na ksenograftach czerniaka pochodzącego od pacjenta. Eksperymenty te dowiodły, że inhibicja Pol θ (z użyciem związku RP-6658) wraz z podaniem inhibitora RAD52 (D-IO3) prowadzi do istotnego zahamowania wzrostu guza. Również, w testach *in vitro* Kandydatka konsekwentnie obserwowała spadek żywotności badanych komórek nowotworowych po potraktowaniu ich kombinacją inhibitorów Pol θ , PARP1 lub RAD52. Co istotne, Doktorantka udowodniła, że obserwowane spadki przeżywalności są efektem wejścia traktowanych komórek na drogę apoptozy. Kandydatka wykazała również, że komórki poddane terapii kombinowanej wykazują zmniejszoną proliferację oraz inwazyjność i powiązała tę obserwację ze wzrostem



populacji komórek w fazie S. Prawidłowo założyła, że może to być efektem akumulacji uszkodzeń DNA w tych komórkach.

Podsumowując, otrzymane dane są spójne i nowatorskie. Otrzymane przez Kandydatkę wyniki badań potwierdziły założenia projektu. Uzyskała bardzo obiecujący efekt syntetycznej letalności komórek rakowych poprzez jednoczesne zablokowanie aktywności Polθ oraz aktywność kluczowych białek zaangażowanych w proces naprawy DNA i zastosowanie chemioterapeutyków. Dodatkowo zaproponowała możliwość potencjalnego połączenia leczenia związkami wraz z radioterapią, udowadniając, że zastosowana kombinacyjna terapia uwrażliwia komórki czerniaka i glejaka na promieniowanie radiacyjne. Wyniki są skrupulatnie opisane i bardzo dobrze opracowane graficznie, w postaci tabel i wykresów. Dyskusja wyników zawarta w manuskryptach jest dojrzała, a wyniki zostały skonfrontowane z dostępnymi danymi literaturowymi.

Poprawność redakcyjna rozprawy

Poprawność redakcyjną rozprawy oceniam pozytywnie. Tekst jest pozbawiony błędów merytorycznych i generalnie błędów edytorskich. Tabele z danymi i wykresy są czytelne i informatywne. Wszystkie elementy wymagane w pracy doktorskiej zostały uwzględnione.

Uwagi

Nie wnoszę uwag. Jedynie proszę Kandydatkę o komentarz do poniższych pytań.

1. Ile jest polimeraz DNA w komórce ludzkiej? Czy może je Pani podzielić na grupy i krótko te zbiory scharakteryzować?
2. Na jakiej podstawie dobrała Pani stężenia związków zastosowanych w eksperymentach *in vitro*?
3. W badaniach *in vitro* komórki były poddane działaniu związków przez 120 h (5 dni)? Z czego wynika tak stosunkowo długi czas ekspozycji komórek na inhibitory/chemioterapeutyki?
4. W jednej z dyskusji w Pani pracach pojawia się wątek wielolekooporności. Czy Pani zdaniem zaproponowane terapie kombinowane mogą być skuteczne w leczeniu guzów lekoopornych? Czy badała Pani poziom ekspresji genów kodujących transportery z rodziny ABC, którym przypisuje się istotną rolę w warunkowaniu zjawiska lekooporności?

Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny praca autorstwa Pani mgr Gabrieli Barszczewskiej-Pietraszek cechuje wysoki poziom naukowy. Nie mam wątpliwości, że Doktorantka posiada szeroką wiedzę naukową, a zastosowanie w badaniach zaawansowanych technik molekularnych oraz wysoki



poziom prezentacji wyników i ich dyskusja świadczą o umiejętnościach badawczych i analitycznych oraz dojrzałości naukowej jakich oczekuje się od osób ze stopniem doktora.

Stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr Gabrieli Barszczewskiej-Pietraszek pt. „Polimeraza dna theta jako nowy cel w spersonalizowanej terapii przeciwnowotworowej, na przykładzie nowotworów mózgu i skóry” spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1 i 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 poz. 574).

Zwracam się do Wysokiej Komisji ds. Stopni Naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne Uniwersytetu Łódzkiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Gabrieli Barszczewskiej-Pietraszek do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Wniosek o wyróżnienie

Całościowy bogaty dorobek naukowy Doktorantki potwierdza lista publikacji (10 pozycji z listy JRC) oraz aktywny udział w konferencjach, sympozjach i szkoleniach zawodowych. Przedstawione w dysertacji wyniki powstały we współpracy z innymi ośrodkami, w tym zagranicznymi i zostały już częściowo opublikowane w piśmie z kategorii Q1. Osiągnięcia i aktywność naukowa Kandydatki świadczą o wyróżniającym zaangażowaniu w prowadzenie badań. Bez wątpienia uzyskane wyniki mają charakter nowatorski. Wpisują się w aktualny światowy trend badań nad rolą elementów molekularnych replisomu, replikaz i systemów naprawczych DNA, warunkujących stabilność genomu, w kontekście ich roli w patogenezie chorób nowotworowych.

Na tej podstawie, wnioskuję do Wysokiej Komisji ds. Stopni Naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne Uniwersytetu Łódzkiego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej „Polimeraza DNA theta jako nowy cel w spersonalizowanej terapii przeciwnowotworowej, na przykładzie nowotworów mózgu i skóry” przygotowanej przez Panią mgr Gabrielę Barszczewską-Pietraszek.

dr hab. n. med. Damian Gawęł, prof. CMKP