

Łódź, 29 sierpnia 2024 r.

Prof. dr hab. Paweł Parniewski  
Instytut Biologii Medycznej  
Polskiej Akademii Nauk

### Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Gabrieli Barszczewskiej-Pietraszek na temat:

„Polimeraza DNA theta jako nowy cel w spersonalizowanej terapii przeciwnowotworowej, na przykładzie nowotworów mózgu i skóry.”

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska podejmuje istotną tematykę badawczą w kontekście przyszłych terapii przeciwnowotworowych i bada istotną rolę białka, zaangażowanego w naprawę pęknięć dwuniciowych DNA, jakim jest polimeraza DNA theta jako nowy cel terapeutyczny.

Praca doktorska stanowi podsumowanie i omówienie wyników badań opublikowanych w postaci dwóch prac eksperymentalnych i jednej przeglądowej, publikowanych w czasopiśmie ujętych w tzw. liście Filadelfijskiej.

W skład pracy wchodzi:

1. **Źródła finansowania**, grant Opus 19, którego kierownikiem był prof. dr hab. Tomasz Śliwiński, Promotor powyższej pracy doktorskiej. Zabrakło w tej części, co jest istotne z mojej perspektywy, informacji o wysokości uzyskanych środków finansowych.
2. **Współpraca naukowa**, w tej części Autorka prezentuje nawiązaną współpracę naukową, konieczną do realizacji celów badawczych. Jest to współpraca z Uniwersytetem Medycznym w Łodzi, Centrum Medycznym Kształcenia Podyplomowego w Warszawie oraz Temple University w Filadelfii. Biorąc pod uwagę zakres i tematykę badań wchodzących w niniejszą rozprawę, dobór jednostek do współpracy był uzasadniony.
3. **Dorobek naukowy**, publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej, w tym jedna praca przeglądowa i dwie eksperymentalne, to dorobek bardzo dobry przy realizacji zadań, prowadzących do uzyskania stopnia doktora. Ich jakość oraz dobór czasopism o wysokim IF oceniam bardzo wysoko. Sumaryczny IF publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej - **16,9**, jest to świadectwo wysokiej klasy prowadzonych badań, co bez wątpienia jest zasługą Doktorantki i Jej Promotorów.
4. **Pozostały dorobek naukowy**, to zestaw 8 publikacji współautorskich oraz 8 komunikatów zjazdowych, o sumarycznym **IF = 30,918**, z których w sześciu jest pierwszym autorem. Ten element dorobku Doktorantki również oceniam bardzo wysoko, świadczy on o Jej zaangażowaniu i umiejętności prezentacji wyników szerszej publiczności.
5. **Wprowadzenie**. W tej części Autorka szczegółowo przedstawia tło naukowe dla podjęcia swoich badań i wskazuje na coraz większe znaczenie polimerazy DNA theta jako celu terapii przeciwnowotworowej opartej na użyciu małowcząsteczkowych inhibitorów białek naprawy DNA oraz syntetycznej letalności. Doktorantka dokładnie opisuje polimerazę DNA theta oraz mechanizmy, w które zaangażowane jest to białko. Następnie nawiązuje do jego kluczowej roli w komórkach nowotworowych, szczególnie tych z defektem naprawy HR lub NHEJ, otwierającej przestrzeń na walkę z nowotworami używając syntetycznej letalności i nowego celu, którym jest polimeraza theta. Aktualne dane literaturowe, na które powołuje się Doktorantka we Wprowadzeniu stały się przesłanką do podjętych badań dotyczących oceny efektu działania inhibitorów polimerazy theta w połączeniu z inhibitorami PARP i RAD52 oraz związkami cytotoksycznymi w liniach komórkowych glejaka i czerniaka.



6. **Cel pracy.** Cele pracy zostały przedstawione prawidłowo w postaci celu głównego i pięciu zadań szczegółowych mających na celu:
- 1) Wyprowadzanie linii pierwotnych do hodowli *in vitro* z guzów litych od pacjentów.
  - 2) Oznaczenie poziomu ekspresji 28 genów zaangażowanych w szlaki naprawy pęknięć dwuniciowych DNA, tj., HR, NHEJ i TMEJ oraz ich korelacja z ekspresją w komórkach prawidłowych w celu wyznaczenia potencjalnych deficytów naprawy DNA prowadzących do syntetycznej letalności lub podwójnej syntetycznej letalności.
  - 3) Ocenę działania cytotoksycznego na komórki glejaka, czerniaka oraz prawidłowe zastosowanych związków i ich kombinacji za pomocą pomiaru żywotności, apoptozy, proliferacji i rozkładu faz cyklu komórkowego oraz ich efektu genotoksycznego poprzez pomiar poziomu fosforylacji histonu H2AX (marker DSBs).
  - 4) Ocenę zastosowania związków i ich kombinacji na komórki glejaka, czerniaka oraz prawidłowe w terapii skojarzonej z promieniowaniem gamma poprzez pomiar DSBs w neutralnym teście kometowym.
  - 5) Ocenę zahamowania wzrostu guza w uzyskanych w myszach NSG ksenograftach z ludzkiej linii czerniaka pod wpływem stosowania inhibitora Polθ samodzielnie lub w kombinacji z inhibitorami białek PARP1 lub RAD52 i związkami alkilującymi.
7. **Materiały i metody.** Zastosowane materiały i metody są dobrze opisane. Doktorantka samodzielnie wyizolowała linie komórkowe z fragmentów guzów uzyskanych od pacjentów Kliniki Neurochirurgii i Chirurgii Nerwów Obwodowych Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego im. Wojskowej Akademii Medycznej - Centralny Szpital Weteranów oraz Kliniki Chirurgii Onkologicznej Wojewódzkiego Wielospecjalistycznego Centrum Onkologii i Traumatologii im. M. Kopernika w Łodzi. W metodologii zostały podane numery zgód koniecznych do podjęcia badań. Doktorantka podaje krótką charakterystykę użytych w badaniach związków oraz wyraźnie rozdziela metodologię badań prowadzonych *in vitro* i *in vivo*. Autorka rozprawy wymieniła szeroki panel przeprowadzonych metod, począwszy od izolacji całkowitego RNA i mRNA, oznaczenia panelu genów na poziomie mRNA, wykonania analiz z wykorzystaniem cytometrii przepływowej, barwienia za pomocą kalceiny i jodku propidyny oraz testu klonogenego i kometowego. To pokazuje, że Pani Gabriela Barszczewska-Pietraszek operuje różnicowaną gamą metod badawczych, koniecznych do realizacji postawionych celów badawczych, co oceniam bardzo dobrze.
8. **Wyniki** zostały opisane w sposób prawidłowy i zwięzły, co jest zrozumiałe ze względu na fakt, że pełne spektrum otrzymanych rezultatów zostało omówione szczegółowo w publikacjach naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Wyniki są interesujące i warte upowszechnienia. Mają charakter nowatorski i stanowią istotny wkład w rozwój podjętej dziedziny badań.
9. **Wnioski** zostały przedstawione prawidłowo i adekwatnie do przeprowadzonych badań oraz celu postawionego na początku niniejszej pracy. Pozwoliły one stwierdzić, że:
- 1) Inhibicja polimerazy DNA  $\theta$  powoduje zmniejszenie żywotności komórek glejaka i czerniaka w około 50%, poprzez indukcję apoptozy, której towarzyszy zmniejszenie proliferacji komórek i ich inwazyjnego charakteru.
  - 2) Efekt przeciwnowotworowy inhibicji polimerazy DNA  $\theta$  wiąże się ze zwiększeniem uszkodzeń DNA oraz uwrażliwienie komórek nowotworowych na radiację.

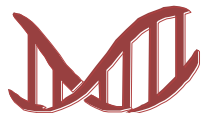


- 3) Skojarzona terapia inhibitorami polimerazy  $\theta$  oraz PARP1 bądź RAD52 powoduje zwiększenie efektu przeciwnowotworowego wobec glejaka i czerniaka, w porównaniu do pojedynczego zastosowania tych związków, poprzez wywołanie syntetycznej letalności.
- 4) Dodanie związków alkilujących temozolomidu lub dakarbazyny do podwójnej inhibicji białek naprawy może znacznie zwiększyć skuteczność leczenia.
- 5) Inhibitory i ich skojarzone zastosowanie wykazywało minimalne działanie toksyczne wobec prawidłowych komórek – melanocytów i astrocytów.
- 6) Zastosowanie inhibitora polimerazy  $\theta$  (RP6685) samodzielnie oraz w połączeniu z inhibitorem RAD52 i związkiem alkilującym powoduje zahamowanie wzrostu guza na modelu ksenograftów czerniaka pochodzącego od pacjentów.

*W tej części zabrakło mi przedstawienia mocnych stron, ale i ograniczeń przeprowadzonych badań, na przykład czy uzyskane wyniki mogą mieć zastosowanie w przypadku innych typów komórek nowotworowych. Jestem także ciekaw ewentualnych dalszych kierunków podjętych badań.*

10. **Literatura uzupełniająca** to lista publikacji cytowanych w rozprawie przez Doktorantkę, które mogą czytelnikowi przybliżyć szerzej tematykę poruszonych badań. Zawiera aktualne prace, głównie z ostatnich 10 lat dotyczące tematyki poruszonej w rozprawie.
11. Następnie Autorka przedstawia **streszczenie** rozprawy w języku polskim i angielskim, w którym w sposób właściwy syntetyzuje najważniejsze wyniki i wnioski z rozprawy doktorskiej. Nie mam zastrzeżeń do tej części pracy.
12. **Publikacje będące podstawą rozprawy doktorskiej.** Doktorantka zamieściła kopie trzech prac wchodzących w skład rozprawy. Również, nie mam zastrzeżeń do tej części.
13. **Oświadczenia o udziale w publikacjach.** We wszystkich przedstawionych publikacjach udział Doktorantki był wiodący i wynosił 66-70% oraz obejmował zaplanowanie i realizację prac doświadczalnych, analizę i wizualizację wyników oraz współtworzenie koncepcji i treści manuskryptów. Autorka uzyskała wymagane oświadczenia od współautorów, potwierdzające Jej udział jako głównego Autora prac.

Podsumowując, należy stwierdzić, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Gabrieli Barszczewskiej-Pietraszek na temat: „Polimeraza DNA theta jako nowy cel w spersonalizowanej terapii przeciwnowotworowej, na przykładzie nowotworów mózgu i skóry”, stanowi zbiór bardzo dobrych publikacji naukowych, w których Doktorantka zaprezentowała oryginalne rozwiązania podjętych problemów badawczych, dowiodła, że posiada umiejętności prowadzenia samodzielnej pracy naukowej i posiada niezbędną wiedzę teoretyczną do prowadzenia tych badań. Rozprawa odpowiada wymogom Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668) stawianym pracom doktorskim. Biorąc pod uwagę udokumentowaną umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych przez Doktorantkę oraz Jej wiedzę teoretyczną w dyscyplinie nauki biologiczne, wnoszę do Komisji ds. Stopni Naukowych Uniwersytetu Łódzkiego w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie Pani mgr inż. Gabrieli Barszczewskiej-Pietraszek do dalszych etapów postępowania doktorskiego.



Oceniana rozprawa doktorska spełnia według mnie kryteria pozwalające na jej wyróżnienie. W szczególności:

1. cechuje się wyróżniającą jakością badań, co zostało potwierdzone w postaci publikacji przedstawionych wyników w trzech czasopismach naukowych o wysokim współczynniku oddziaływania IF (łącznie IF = 16,9),
2. posiada szczególne walory poznawcze i aplikacyjne, wyniki mają charakter nowatorski i stanowią istotny wkład w rozwój podjętej dziedziny badań,
3. Udział Doktorantki w przeprowadzonych badaniach jest wiodący, co dowodzi Jej samodzielności w prowadzeniu tych, jak i przyszłych pracach naukowych.

Zatem, wnoszę do Komisji ds. Stopni Naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne Uniwersytetu Łódzkiego o wyróżnienie rozprawy Pani mgr inż. Gabrieli Barszczewskiej-Pietraszek.

Z poważaniem,

Prof. Paweł Parniewski