



Prof. dr hab. n. med. Izabela Zawlik
Kierownik Zakładu Genetyki Ogólnej
Instytut Nauk Medycznych
Kierownik Laboratorium Biologii Molekularnej
Przyrodniczo–Medyczne Centrum Badań Innowacyjnych
Kolegium Nauk Medycznych
Uniwersytet Rzeszowski

Rzeszów, 28.09.2024

Recenzja pracy doktorskiej mgr Gabrieli Barszczewskiej-Pietraszek pt. „Polimeraza DNA theta jako nowy cel w spersonalizowanej terapii przeciwnowotworowej, na przykładzie nowotworów mózgu i skóry”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Gabrieli Barszczewskiej-Pietraszek została wykonana pod kierunkiem Pana Prof. dr hab. Tomasza Śliwińskiego oraz Dr n. biol. Piotra Czarnego pełniącego rolę promotora pomocniczego. Praca została wykonana w Katedrze Genetyki Molekularnej Instytutu Biochemii na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Badania prowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej zostały sfinansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach grantu OPUS 19 nr UMO-2020/37/B/NZ7/00422 pt.: „Polimeraza DNA θ jako nowy cel w spersonalizowanej terapii przeciwnowotworowej”, którego kierownikiem był Prof. dr hab. Tomasz Śliwiński.

Ocena formalna i metodologiczna pracy

Ocena formalna

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Gabrieli Barszczewskiej-Pietraszek stanowi zbiór trzech powiązanych tematycznie artykułów naukowych; dwa z tych artykułów są pracami oryginalnymi, a jeden jest pracą przeglądową. Wszystkie publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej są opracowaniami zbiorowymi, w których Pani mgr Gabriela Barszczewska-Pietraszek jest pierwszym autorem. Sumaryczny współczynnik oddziaływania publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wynosi 16,9, a punktacja MEiN wynosi 420 pkt.

W rozprawie doktorskiej zawarto także pozostały dorobek publikacyjny Doktorantki, na który składa się osiem publikacji wysoko punktowanych o zasięgu międzynarodowym oraz

osiem komunikatów zjazdowych. Sumaryczny współczynnik oddziaływania całego dorobku publikacyjnego łącznie z publikacjami wchodzącymi w skład rozprawy doktorskiej wynosi 47,819, co w przeliczeniu na punktację MEiN wynosi 1240 pkt. Całkowity dorobek publikacyjny Pani mgr Gabrieli Barszczewskiej-Pietraszek jest imponujący biorąc pod uwagę wczesny etap kariery naukowej Doktorantki.

W rozprawie doktorskiej zawarto również oświadczenia współautorów artykułów wchodzących w skład doktoratu, które jednoznacznie wskazują na wiodącą rolę Doktorantki w realizacji prac badawczych. Udział Doktorantki we wszystkich przedstawionych pracach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej jest wysoki. Wkład pracy mgr Gabrieli Barszczewskiej-Pietraszek został określony w każdej z prac w zakresie od 66% do 70%. Tak duży udział Doktorantki stanowi niezaprzeczalnie podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora na podstawie przedstawionego cyklu prac. Wszystkie publikacje stanowiące rozprawę doktorską mają wysoką wartość merytoryczną i metodyczną.

Praca doktorska została wydana w formie oprawionego maszynopisu zawierającego następujące rozdziały: źródła finansowania, współpraca naukowa, dorobek naukowy, wstęp, cel pracy, materiały i metody badawcze, wyniki, wnioski, literatura, streszczenie w języku polskim i angielskim, publikacje będące podstawą rozprawy doktorskiej oraz oświadczenia współautorów. Wstęp stanowi ogólną analizę aktualnego stanu wiedzy na temat podjętego problemu badawczego uzasadniając celowość prowadzonych badań. W rozdziale tym w skrócie przedstawiono podstawowe informacje dotyczące budowy polimerazy DNA theta ($Pol\theta$), roli $Pol\theta$ w szlaku naprawy pęknięć dwuniciowych DNA, roli $Pol\theta$ w innych mechanizmach naprawczych i procesach komórkowych oraz w procesie nowotworzenia, a także koncepcji syntetycznej letalności. W pracy doktorskiej postawiono hipotezę stanowiącą, że celowanie w $Pol\theta$, w połączeniu z hamowaniem PARP1 lub RAD52 wywoła syntetyczną letalność i tym samym zwiększy skuteczność terapeutyczną w glejaku i czerniaku w porównaniu do inhibicji tylko jednym inhibitorem. W następnym rozdziale prawidłowo sformułowano cele pracy. Szczegółowe cele pracy zostały precyzyjnie przedstawione w pięciu punktach i poprawność ich sformułowania również nie budzi wątpliwości. W kolejnym rozdziale wyszczególniono zastosowane materiały i metody badawcze. Materiałem badawczym były pierwotne linie komórkowe wyprowadzone z fragmentów tkanek nowotworowych guza mózgu i skóry - glejaka wielopostaciowego (linia GBM21) oraz czerniaka (linia MLN21). Jako kontrole do eksperymentów zastosowano komercyjnie dostępne linie komórek prawidłowych astrocytów i melanocytów. Materiał do części badań na modelu zwierzęcym stanowiły ksenografty otrzymane z ludzkiej linii komórek czerniaka MLN21, wszczepionych podskórnice do myszy NOD SCID γ . Doktorantka wymienia jakie związki zostały użyte w badaniach; należą do nich inhibitory $Pol\theta$, PARP1, RAD52 i związki alkilujące używane obecnie w terapii glejaka

i czerniaka. Doktorantka wymienia jakie metody badawcze zostały użyte w pracy; należą do nich m.in. cytometryczna analiza cyklu komórek, test klonogeny do oceny proliferacji i inwazyjności komórek czy metoda Real-Time PCR do analizy ekspresji 28 genów zaangażowanych w szlaki naprawy pęknięć dwuniciowych DNA. W kolejnych rozdziałach Doktorantka sprawozdaje uzyskane wyniki badań i formułuje wnioski w sześciu punktach.

Do pracy załączono kopie trzech powiązanych tematycznie artykułów naukowych. Jeden oryginalny artykuł został opublikowany w *International Journal of Molecular Science*, natomiast drugi oryginalny artykuł w momencie przygotowywania tej recenzji przeszedł wstępną kontrolę jakości i był w trakcie edycji w *Molecular Cancer Therapeutics*, jak wynika z treści listu od tego wydawnictwa załączonego w pracy doktorskiej. Te dwa czasopisma naukowe mają wysoki współczynnik oddziaływania, co potwierdza wysoką wartość poznawczą i wysoki poziom naukowej przedstawionej pracy doktorskiej. Praca przeglądowa dobrze odzwierciedla aktualny stan wiedzy na temat roli Pol θ w mechanizmach naprawy pęknięć dwuniciowych DNA i znaczenia inhibitorów Pol θ jako potencjalnych związków stosowanych w terapiach przeciwnowotworowych. W załączonych pracach nie znajduję błędów merytorycznych, metodologicznych czy edytorskich.

Podsumowując, zaprezentowana praca doktorska z załączonym cyklem publikacji posiada wysoką wartość merytoryczną i metodyczną, co jest właściwe dla przeprowadzenia postępowania doktorskiego.

Poprawność formułowania hipotez i założeń badawczych

Doktorantka precyzuje założenia i cele pracy w prawidłowy sposób. Podstawowym celem pracy było poznanie znaczenia Pol θ jako głównego celu terapeutycznego. Cel ten osiągnięto poprzez analizę działania inhibitorów Pol θ na pierwotne linie komórkowe wyprowadzone z nowotworów mózgu i skóry oraz na uzyskanych w myszach NSG ksenograftach z ludzkiej linii czerniaka, samodzielnie jak i w połączeniu z inhibitorami białek PARP1 lub RAD52 oraz związkami cytotoksycznymi temozolamidem i dekarbazyną, w zależności od rodzaju tkanki. Doktorantka osiągnęła główny cel pracy poprzez następujące cele szczegółowe:

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.

Wszystkie etapy badawcze zostały prawidłowo zaprojektowane i zrealizowane w kontekście spełnienia założonych celów pracy doktorskiej. Cele badawcze pracy zostały w pełni zrealizowane z zastosowaniem szeregu metod badawczych na pierwotnych liniach komórkowych czerniaka i glejaka pochodzących od pacjentów. Dane biologiczno-doświadczalne zostały starannie opisane w dwóch oryginalnych publikacjach. Sformułowane wnioski są jednoznaczną odpowiedzią na przedstawione cele pracy.

Trafność doboru metod i narzędzi badawczych oraz umiejętność ich zastosowania

W pracy doktorskiej w sposób prawidłowy dobrano metody badawcze. W publikacjach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wszystkie metody zostały szczegółowo opisane. W badaniach na modelach linii komórkowych zastosowano następujące metody: cytometryczną ocenę przeżywalności oraz ścieżki śmierci komórkowej z wykorzystaniem znakowania jodkiem propidyny i aneksyną V; ocenę uszkodzeń DNA poprzez pomiar fosforylacji histonu H2AX oraz neutralną wersję testu kometowego, po dodatkowym zastosowaniu promieniowania gamma; cytometryczną analizę cyklu komórek utrwalonych w 70% EtOH i wybarwionych jodkiem propidyny z RNazą; ocenę proliferacji i inwazyjności komórek za pomocą testu klonogenego; analizę ekspresji genów zaangażowanych w naprawę DSBs z użyciem Real-Time PCR; wizualizację zmian morfologicznych komórek za pomocą podwójnego barwienia kalceiną AM i jodkiem propidyny. Natomiast w eksperymencie z udziałem zwierząt dokonano pomiaru inhibicji wzrostu guza na podstawie zmian w objętości tkanki nowotworowej. Zastosowane metody zapewniły osiągnięcie celu projektu i uzyskanie ciekawych wyników.

Dobór piśmiennictwa i umiejętność wykorzystania źródeł

Piśmiennictwo w jednej z oryginalnych prac obejmuje 51 pozycji, a w drugiej 39 pozycji. Piśmiennictwo w pracy przeglądowej obejmuje 73 pozycji literaturowych. Zaprezentowane piśmiennictwo jest właściwie dobrane i jest bezpośrednio związane z tematyką pracy. Doktorantka w sposób rzeczowy prezentuje swoje tezy wspierając się najnowszym piśmiennictwem naukowym.

Ocena merytoryczna pracy

Trafność problematyki badawczej i jej oryginalność

Problem badawczy podjęty przez Doktorantkę jest niezwykle istotny dla rozwoju spersonalizowanej terapii przeciwnowotworowej. Obecnie terapie spersonalizowane stanowią obiecującą formę, z którą wiąże się nadzieje na poprawę skuteczności leczenia i wydłużenie długości przeżycia pacjentów z chorobą nowotworową. W ostatnich latach coraz większe zainteresowanie wzbudza polimeraza DNA theta jako nowy cel molekularny w terapii przeciwnowotworowej. Obecnie w ramach medycyny personalizowanej w onkologii stosuje się inhibitory białek naprawczych DSBs, które indukują śmierć komórek nowotworowych w oparciu o syntetyczną letalność. Strategia zastosowana w pracy doktorskiej opiera się na niezwykle interesującym i nowatorskim podejściu zastosowania inhibitorów Pol θ , w połączeniu z hamowaniem PARP1 lub RAD52 w celu wywołania syntetycznej letalności i tym samym zwiększenia skuteczności terapeutycznej w glejaku i czerniaku.

Zarówno glejak jak i czerniak należy do nowotworów charakteryzujących się złym rokowaniem, dlatego istnieje zapotrzebowanie na poprawę skuteczności istniejących terapii oraz opracowywanie nowych metod leczenia. W związku z powyższym temat podjęty przez Doktorantkę uważam za wybitnie interesujący i szczególnie istotny dla opracowania nowej terapii spersonalizowanej w glejaku i czerniaku.

Materiałem badawczym wykorzystanym w niniejszej pracy doktorskiej były pierwotne linie komórkowe wyprowadzone z fragmentów tkanek nowotworowych pochodzących od pacjentów z glejakiem wielopostaciowym i czerniakiem. W pracy przeprowadzono również eksperymenty na linii komórek czerniaka MLN21 z wykorzystaniem myszy NSG (NOD scid gamma).

W tym miejscu należy zauważyć, że w pracy zabrakło charakterystyki kliniczno-diagnostycznej włączonych do badań pacjentów, od których pobrano fragmenty tkanki nowotworowej do celów wyprowadzenia linii pierwotnych. Szczególnie istotne znaczenie w kontekście prowadzonych badań może mieć identyfikacja charakterystycznych dla danego typu nowotworu zmian molekularnych w tkankach nowotworowych, tj. hipermetylacja

promotora genu *MGMT* w glejaku czy obecność mutacji w genach *BRAF*, *NRAS* w czerniaku, które powinny obecnie być rutynowo analizowane w celu doboru terapii.

W tym miejscu nasuwają się mi pytania do Doktorantki:

1. Czy Doktorantka posiada dane dotyczące obecności takich zaburzeń molekularnych w badanych tkankach?
2. Czy obecność powyżej wymienionych zmian molekularnych może mieć wpływ na działanie inhibitorów Pol θ ?

W ramach realizacji pracy doktorskiej wykazano, że inhibicja Pol θ zmniejsza żywotność komórek glejaka i czerniaka o około 50%, poprzez indukcję apoptozy, której towarzyszy zmniejszenie proliferacji komórek i podwyższenie poziomu uszkodzenia DNA. Kolejne badania wykazały, że terapia skojarzona inhibitorami Pol θ i PARP1 lub RAD52 skutkuje zwiększonym działaniem przeciwnowotworowym w komórkach glejaka i czerniaka, w porównaniu z pojedynczym zastosowaniem tych związków, co może wynikać z indukowania syntetycznej letalności. Ponadto wykazano, że dodanie związków alkilujących: temozolomidu lub dakarbazyiny do skojarzonej inhibicji dwóch białek naprawczych może znacznie zwiększyć skuteczność leczenia, jednakże wiąże się to również ze zwiększoną toksycznością dla normalnych komórek.

W obu załączonych publikacjach oryginalnych dyskusja została napisana w sposób rzeczowy i wnikliwy. Dyskusja w pełni ukazuje bardzo dobre zorientowanie Doktorantki w aktualnej literaturze dotyczącej problemu badawczego. Na podstawie uzyskanych wyników prawidłowo sformułowano wnioski końcowe sugerujące, że hamowanie Pol θ z jednoczesnym hamowaniem PARP lub Rad52 przynosi syntetycznie letalny efekt na komórki glejaka i czerniaka, pozostawiając minimalny wpływ na komórki prawidłowe. Doktorantka potwierdziła zatem, że Pol θ może być potencjalnym celem w ukierunkowanych terapiach przeciwnowotworowych w glejaku i czerniaku. Ten aspekt pracy stanowi element nowości i oryginalne osiągnięcie Doktorantki. Jednakże potwierdzenie powyższych obserwacji wymaga przeprowadzenia dalszych badań.

Znaczenie uzyskanych wyników dla nauki i praktyki

Uzyskane w ramach realizacji wyniki stanowią istotny wkład w dotychczasową wiedzę naukową dotyczącą opracowania terapii przeciwnowotworowej opartej na zastosowaniu inhibitorów Pol θ , w połączeniu z hamowaniem PARP1 lub RAD52 w celu wywołania syntetycznej letalności. Uzyskane w pracy wyniki są niezwykle istotne z punktu widzenia poznawczego i aplikacyjnego, ponieważ otwierają możliwości praktycznego ich zastosowania w celu opracowania skuteczniejszych i nowych terapii przeciwnowotworowych. Wykazanie w

pracy że, skojarzona terapia inhibitorami Pol θ oraz PARP1 bądź RAD52 powoduje zwiększenie efektu przeciwnowotworowego wobec glejaka i czerniaka w porównaniu do pojedynczego zastosowania tych związków i przy minimalnym wpływie na komórki prawidłowe otwiera możliwości rozwoju skuteczniejszych terapii przeciwnowotworowych.

Wnioski końcowe

Prezentowana praca doktorska wskazuje na bardzo dobre przygotowanie teoretyczne Doktorantki oraz opanowanie przez nią warsztatu badawczego. Wysoko oceniam wartość naukową przedstawionej pracy doktorskiej. Rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i prezentuje ogromną wiedzę teoretyczną Doktorantki we wskazanej dyscyplinie naukowej oraz wskazuje na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Rozprawa doktorska pt: „Polimeraza DNA theta jako nowy cel w spersonalizowanej terapii przeciwnowotworowej, na przykładzie nowotworów mózgu i skóry” w pełni spełnia warunki określone w art.187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2021 poz. 478 ze zm). Wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Gabrieli Barszczewskiej-Pietraszek do dalszych etapów postępowania doktorskiego. Jednocześnie, z uwagi na wysoką wartość poznawczą i aplikacyjną prowadzonych badań pragnę przedłożyć wniosek o wyróżnienie niniejszej pracy doktorskiej.

Prof. dr hab. n. med. Izabela Zawlik