



Łódź, 27 lipca 2022

Prof. dr hab. Jarosław Dziadek

Kierownik Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium

Instytut Biologii Medycznej PAN

**Ocena pracy doktorskiej mgr Anny Maciei pt. „Identyfikacja mechanizmu uwrażliwiania komórek ludzkiego raka jajnika na leki przeciwnowotworowe za pomocą inhibitorów szlaków naprawy podwójnych pęknięć DNA”.**

Chemioterapia jest najczęściej stosowaną metodą ogólnoustrojową w leczeniu nowotworów. Podawane pacjentowi substancje cytostatyczne zaburzają cykl komórkowy prowadząc do śmierci komórki lub zahamowania jej rozwoju i podziałów. Chemioterapeutyki nie działają wybiórczo na komórki nowotworu, lecz są aktywne wobec wszystkich szybko się dzielących komórek pacjenta. Równoczesne zastosowanie różnych grup cytostatyków w tym leków alkilujących, inhibitorów mitozy, inhibitory topoizomerazy I i II, antybiotyków o działaniu cytostatycznym czy antymetabolitów pozwala na zwiększenia skuteczności procesu leczenia. Poważną przeszkodą w skutecznej terapii jest często pojawiająca się lekooporność komórek nowotworowych o podłożu kinetycznym, biochemicznym czy farmakologicznym. W przypadku oporności biochemicznej przyczyną może być m.in. brak aktywacji lub nasilona inaktywacja leku, aktywne usuwanie leku z komórki, czy nasilona naprawa DNA. W tym ostatnim przypadku skuteczna może okazać się terapia zawierająca inhibitory procesów naprawy DNA uwrażliwiające komórki na uszkodzenia materiału genetycznego. Możliwość jednoczesnego zastosowania leków przeciwnowotworowych takich jak cisplatyna i etopozyd prowadzących do uszkodzeń DNA oraz inhibitorów naprawy podwójnych pęknięć DNA w raku jajnika było przedmiotem ocenianej dysertacji.

Z punktu widzenia zdrowia publicznego, konieczności wprowadzania nowych schematów leczenia u pacjentów onkologicznych, oraz na podstawie aktualnej literatury naukowej, tematykę pracy Doktorantki uważam za niezwykle aktualną i ważną. Recenzowana praca została wykonana w Katedrze Genetyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego pod opieką



prof. dr hab. Tomasza Popławskiego co zapewniło Doktorantce dostęp do niezbędnych dla wykonywanej pracy materiałów i technik badawczych.

Układ tekstu jest typowy dla prac eksperymentalnych. Część doświadczalna pracy jest poprzedzona dobrze przemyślanym wstępem literaturowym napisanym bardzo ładnym językiem naukowym, przedstawiającym aktualne dane dotyczące epidemiologii raka jajnika, a także czynniki ryzyka rozwoju tego nowotworu, w tym czynniki genetyczne w dziedzicznym i sporadycznym raku jajnika. Ze względu na cel swoich badań Doktorantka opisuje także, ze znajomością tematu, mechanizmy odpowiedzi komórki na uszkodzenia DNA, podstawowe mechanizmy naprawy DNA a także leki stosowane w terapii raka jajnika oraz mechanizmy lekooporności komórek nowotworowych.

Celem przedstawionej do oceny pracy była identyfikacja mechanizmu uwrażliwiania komórek ludzkiego jajnika na leki przeciwnowotworowe CDDP i VP-16 za pomocą inhibitorów szlaków naprawy podwójnych pęknięć DNA. Nie budzi moich wątpliwości wybór przez Doktorantkę cisplatyny oraz VP-16 jako ważnych leków w terapii raka jajnika. **Prosiłbym natomiast Doktorantkę o uzasadnienie wyboru inhibitorów naprawy podwójnych pęknięć DNA jako potencjalnych leków wspomagających.** Jak Doktorantka słusznie opisuje we Wstępie pracy cisplatyna ma zdolność do wiązania się z DNA, tworzenia wewnątrz- i między-niciowych wiązań i zaburzania mechanizmów transkrypcji i translacji. Tego typu uszkodzenia w cząsteczce DNA są preferencyjnie usuwane przez system naprawy poprzez wycinanie nukleotydów (NER) a nie systemy NHEJ czy też HR a podwójne pęknięcia są raczej wtórnym uszkodzeniem generowanym w genomie. **Czy rozważała Doktorantka włączenie do badań również inhibitory procesu NER? Czy inhibitory takie są dostępne i były już badane w tym aspekcie?**

W rozdziale Materiały i Metody autorka zapoznaje czytelnika z zastosowaną metodologią badań. Wszystkie wykorzystywane procedury są dokładnie opisane w sposób umożliwiający ich odtworzenie w innym laboratorium. Na szczególną uwagę zasługuje włączenie do badań panelu 6 linii komórkowych ludzkiego raka jajnika różniących się wrażliwością na CDDP w postaci trzech układów eksperymentalnych. Biorąc pod uwagę znaczenie mutacji w genach związanych z procesami naprawy DNA zarówno w dziedzicznym jak i sporadycznym raku jajnika ciekawy jestem czy Doktorantka posiada wiedzę na temat ewentualnej obecności w wybranych do badań liniach komórkowych mutacji w genach BRCA1 i BRCA2, szczególnie biorąc pod uwagę rolę



BRCA2 w naprawie podwójnych pęknięć DNA poprzez rekrutację Rad51 do miejsca uszkodzenia, genach systemu naprawy błędnie sparowanych zasad (MMR), w których mutacje są identyfikowanych w zespole Lyncha oraz sporadycznym raku jajnika, czy też genach systemu NER. Ewentualna obecność takich mutacji w genach procesów naprawy DNA poszczególnych linii czy też zmieniony poziom ich ekspresji miałby zasadniczy wpływ na interpretację uzyskanych przez Doktorantkę wyników. **Proszę Doktorantkę o komentarz na ten temat podczas publicznej obrony.**

W części eksperymentalnej Doktorantka oceniła na sześciu liniach komórkowych raka jajnika cytotoksyczne działanie cisplatyny, etopozydu, trzech inhibitorów procesu homologicznej rekombinacji oraz dwóch naprawy poprzez łączenie niehomologicznych końców DNA, zarówno pojedynczo jak i we wspólnym działaniu. W badanych stężeniach inhibitory szlaków naprawy NHEJ i HR nie działały cytotoksycznie na badane linie komórkowe, dla wybranych linii obserwowano natomiast zwiększenie cytotoksyczności CDDP lub VP-6 w obecności inhibitorów NHEJ lub HR. Efekt ten był szczególnie widoczny dla linii z dwóch pierwszych układów eksperymentalnych (U1-U2) w obecności inhibitorów NHEJ, nie był natomiast widoczny dla U3. **Ciekawy jestem czy na podstawie wiedzy o poszczególnych liniach komórkowych można byłoby zaproponować mechanizm molekularny związany z brakiem odpowiedzi linii PEO1 i PEO4 na inhibitory naprawy podwójnych pęknięć DNA?** W dalszej części badań, Doktorantka skupiła się na układach badawczych U1 i U2 oceniając genotoksyczne działanie leków i inhibitorów. Do oceny uszkodzeń DNA wykorzystano alkaliczną wersję testu kometowego oraz ocenę fosforylacji histonu H2AX. W obu układach badawczych Doktorantka zaobserwowała zwiększoną genotoksyczność CDDP/VP-16 w obecności inhibitorów naprawy podwójnych pęknięć DNA. **Z drugiej strony różnice w uszkodzeniach DNA z inhibitorami naprawy i bez nich wynosiły tylko kilkanaście procent, czy zdaniem Doktorantki może to wynikać z faktu, ograniczonej ilości dwuniciowych pęknięć DNA akumulowanych w komórkach poddanych działaniu cisplatyny? Czy po analizie wyników dla linii wrażliwych i opornych na cisplatynę można wnioskować, że oporność na CDDP nie była związana z aktywacją procesu naprawy dwuniciowych pęknięć DNA?** Niewielkie różnice związane z zastosowaniem inhibitorów procesów naprawy podwójnych pęknięć DNA zaobserwowano również na poziomie cyklu komórkowego oraz odnotowano istotny wzrost poziomu aktywnych kaspaz wskazujących na indukcję apoptozy.



Bardzo interesującym podejściem metodycznym Doktorantki było zastosowanie w kolejnym etapie badań hodowli komórek w warunkach beztlenowych. W warunkach hipoksji zaobserwowano wzmocnienie cytotoksycznego efektu w obecności inhibitorów DNA wyłącznie w przypadku linii cisplatynowrażliwej i tylko dla inhibitorów NHEJ. Nie zaobserwowano również zmian w genotoksyczności oraz zmian w cyklu komórkowym wynikających z zastosowania DRIs. Dla linii PEA2 zaobserwowano natomiast znaczący wzrost poziomu kaspaz wykonawczych w szlaku apoptozy. **Ciekawy jestem jak Doktorantka interpretuje znaczące różnice w poziomie kaspaz przy jednoczesnym braku różnic w cyto- oraz genotoksyczności w linii PEA2 w obecności inhibitorów naprawy DNA.** Bardzo ciekawych informacji dostarczyły także badania ekspresji genów szlaków naprawy DNA w warunkach tlenowych i beztlenowych. Nie do końca jasne jest dla mnie do czego porównano poziom ekspresji panelu genów linii PEA2 w warunkach tlenowych przedstawionych na rycinie 50. Natomiast Tabele 33 i 34 jasno wskazują na znaczące zmiany w ekspresji szeregu genów napraw DNA w warunkach beztlenowych. W tej części pracy zabrakło mi bardziej szczegółowych prób interpretacji uzyskanych wyników szczególnie w aspekcie znaczącej nadprodukcji niektórych genów szlaków MMR czy NER.

Dyskusja pracy została napisana bardzo dojrzałe, ze znakomitą znajomością tematu, a Doktorantka w sposób krytyczny odnosi uzyskane przez siebie wyniki do danych literaturowych.

Rozdział „Wnioski” stanowi bardzo dobre podsumowanie przeprowadzonych badań. Doktorantka wyciąga w pełni uprawnione wnioski mające podstawę w postaci przeprowadzonych analiz i danych literaturowych.

Po wnikliwym zapoznaniu się z pracą doktorską Pani Anny Maciei uważam, że przedstawiona do oceny praca zawiera oryginalne i bardzo wartościowe wyniki i spełnia wszystkie kryteria zawarte w ustawie z dnia 14.03.2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz. U. z 2003 Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami). Wnoszę do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. Stopni Naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie Pani Anny Maciei do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik  
Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacteriana



Prof. dr hab. Jarosław Dziadek