

Zakład Biologii Medycznej
Instytut Biologii
Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach
ul. Uniwersytecka 7
25-406 Kielce
tel. 41 349 63 31
email: arabski@ujk.edu.pl

Kielce, 29.08.2023

Dr hab. Michał Arabski
Zakład Biologii Medycznej
Wydział Nauk Ścisłych i Przyrodniczych
Uniwersytet Jan Kochanowskiego w Kielcach

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Małgorzaty Drzewieckiej

Inhibitory białek naprawy DNA jako potencjalne leki w spersonalizowanej terapii przeciwnowotworowej, opartej o syntetyczną letalność
stanowiącej podstawę ubiegania się o nadanie stopnia doktora

Wzrost zachorowalności na nowotwory złośliwe stanowi ogromny problem o zasięgu globalny. Poszukiwanie nowych terapii onkologicznych, zwiększenie wykrywalności nowotworów we wczesnych stadiach oraz poprawa jakości życia pacjentów stanowią kluczowe wyzwania naukowe mające bezpośredni wpływ na zdrowie społeczeństwa. Opracowanie i dostęp do innowacyjnych terapii wymaga złożony analiz o charakterze "omicznym" na zdefiniowanych próbach. Badania te dotyczą przede wszystkim problemów związanych z heterogennością nowotworu i nabytą opornością, stanowiące ograniczenie sukcesu onkologii. Na podstawie danych literaturowych można obecnie wyodrębnić co najmniej dwa kierunki badań w poszukiwaniu nowych terapii tj. celowanie w specyficzne dla nowotworu nieprawidłowości na poziomie molekularne oraz związane z szeroko rozumianą immuno-onkologią. Wydaje się, iż opracowanie skutecznej strategii precyzyjnego leczenia raka wymaga podejścia kompleksowego opartego na stosowaniu kombinacji leków ukierunkowanych na kilka zmian molekularnych lub cech charakterystycznych dla nowotworu.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Małgorzaty Drzewieckiej pt. "*Inhibitory białek naprawy DNA jako potencjalne leki w spersonalizowanej terapii przeciwnowotworowej, opartej o syntetyczną letalność*" w pełni wpisuje się w powyższy, aktualny nurt badań z zakresu onkologii precyzyjnej. Cel pracy został jasno sformułowany i osiągnięty tj. ocena skuteczności inhibitora HDAC (VPA) w skojarzeniu z inhibitorem PARP1 (BMN-673), HDAC i związku alkilującego na liniach komórkowych wyizolowanych z guzów litych mózgu i skóry. Osiągnięcie

powyższego celu umożliwiła realizacja zadań szczegółowych związanych z pozyskaniem komórek glejaka do hodowli *in vitro* z materiału pobranego od pacjentów, analiza efektów komórkowych zastosowanych inhibitorów i związku oraz określenie zależności pomiędzy inhibicją deacetylaz histonów, a odpowiedzią komórkową po ekspozycji na inhibitor PARP1 i związek alkilujący. W tej części rozprawy chciałbym podkreślić wybór materiału badawczego, który nadaje rozprawie zdecydowanie charakter aplikacyjny o potencjale klinicznym. W badaniach wykorzystano linie pierwotne glejaka (GBM113 i GBM114) i czerniaka DMBC11. Opracowanie i zastosowanie techniki hodowlanej *in vitro* fragmentów guzów od pacjentów nadaje badaniom charakter spersonalizowany. Ciekawy jestem opinii Doktorantki na ile możliwe jest przeprowadzenie tej procedury w warunkach kliniki, indywidualnie do potrzeb pacjentów uwzględniając jej złożoność i czas.

Praca doktorska Pani mgr Małgorzaty Drzewieckiej stanowiąca podstawę do nadania stopnia doktora została wykonana w Katedrze Genetyki Molekularnej Instytutu Biochemii na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem prof. dr hab. Tomasza Śliwińskiego oraz dr hab. n med. Macieja Radka, prof. UMED. Badania zostały sfinansowane w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki HARMONIA oraz InterDOC-START-Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie. Badania realizowane były w ramach współpracy naukowej o zasięgu międzynarodowym tj. w Klinice Neurochirurgii i Chirurgii Nerwów Obwodowych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, w Pracowni Cytometrii Przepływowej Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Warszawie oraz w Temple University, Philadelphia, USA. W ostatnim z wymienionych ośrodków Doktorantka odbyła 3-miesięczny staż naukowy bezpośrednio związany z tematyką badawczą pracy doktorskiej.

Na rozprawę składa się cykl spójnych tematycznie trzech publikacji naukowych: dwóch artykułów doświadczalnych oraz pracy przeglądowej (sumarycznie 270 pkt. MEiN; IF = 11.682):

1. Drzewiecka M, Barszczewska-Pietraszek G, Czarny P, Skorski T, Śliwiński T. Synthetic Lethality Targeting Polθ. *Genes (Basel)*. 2022 Jun 20;13(6):1101. doi: 10.3390/genes13061101. PMID: 35741863; PMCID: PMC9223150.
2. Drzewiecka M, Gajos-Michniewicz A, Hoser G, Jaśniak D, Barszczewska-Pietraszek G, Sitarek P, Czarny P, Piekarski J, Radek M, Czyż M, Skorski T, Śliwiński T. Histone Deacetylases (HDAC) Inhibitor-Valproic Acid Sensitizes Human Melanoma Cells to Dacarbazine and PARP Inhibitor. *Genes (Basel)*. 2023 Jun 20;14(6):1295. doi: 10.3390/genes14061295. PMID: 37372475; PMCID: PMC10298302. Świdorska, E.; Strycharz, J.; Wróblewski, A.; Czarny, P.; Szemraj, J.; Drzewoski, J.; Śliwińska, A. Chronic and Intermittent Hyperglycemia Modulates

Expression of Key Molecules of PI3K/AKT Pathway in Differentiating Human Visceral Adipocytes. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 7712. <https://doi.org/10.3390/ijms22147712>

3. Drzewiecka, M.; Jaśniak, D.; Barszczewska-Pietraszek, G.; Czarny, P.; Kobrzycka, A.; Wieczorek, M.; Radek, M.; Szemraj, J.; Skorski, T.; Śliwiński, T. Class I HDAC Inhibition Leads to a Downregulation of FANCD2 and RAD51, and the Eradication of Glioblastoma Cells. *J. Pers. Med.* 2023, 13, 1315. <https://doi.org/10.3390/jpm13091315>.

Udział Doktorantki w powstaniu powyższych prac jest dominujący (66%-70%) i polegał ona na prowadzeniu hodowli komórkowych linii glejaków, analizach z zastosowaniem technik *Real Time* PCR, Western blot oraz opracowaniu danych cytometrycznych. W przypadku pracy przeglądowej udział Doktorantki dotyczył opracowania jej koncepcji i przygotowaniu artykułu do publikacji.

W pracach wchodzących w skład rozprawy, Doktorantka zastosowała szeroki i zróżnicowany wachlarz metod badawczych, tj. technik hodowli komórek *in vitro*, ilościowy PCR w czasie rzeczywistym, Western blot, test klonogenny, wersję neutralną testu kometowego oraz cytometrię przepływową w kierunku oceny poziomu apoptozy/nekrozy oraz fosforylacji histonu γ -H2AX w badanym materiale. Świadczy to o wysokich umiejętnościach pracy laboratoryjnej Doktorantki co zasługuje na szczególne podkreślenie.

Wyniki badań prezentowane były na krajowych i zagranicznych konferencjach naukowych. Uzyskane w rozprawie wyniki zestawiono z najnowszymi, prawidłowo dobranymi danymi opublikowanymi na łamach prestiżowych czasopism naukowych, w ramach poszczególnych publikacji naukowych.

Pierwsza z nich (**Publikacja 1**; *Synthetic Lethality Targeting Polθ*) jest wprowadzeniem teoretycznym do tematyki badawczej realizowanej w ramach pracy doktorskiej. W artykule omówiono pojęcie syntetycznej letalności w komórkach ludzkich w kontekście chemioterapii przeciwnowotworowej i mechanizmów naprawy pęknięć dwuniciowych (DSB). Przedstawiono rolę polimeraza DNA theta w alternatywnym szlaku naprawy DSB jako celu w leczeniu nowotworów, jej strukturę i funkcje w komórkach prawidłowych. Przedstawiono najnowsze dane związane z udziałem polimerazy DNA theta w naprawie przez rekombinację homologiczną, SSA, łączenie końców niehomologicznych oraz za pośrednictwem Polθ. Następnie Doktorantka odniosła się do roli Polθ w nowotworach złośliwych, w tym jako cel terapii przeciwnowotworowych z udziałem inhibitorów.

Publikacja 2 (*Histone Deacetylases (HDAC) Inhibitor-Valproic Acid Sensitizes Human Melanoma Cells to Dacarbazine and PARP Inhibitor*) przedstawia wyniki badań nad uwrażliwieniem linii

pierwotnej czerniak złośliwego skóry na dakarbazynę DTIC i/lub w połączeniu z inhibitorem PARP (talazoparib; BMN-673) przez inhibitor deacetylazy histonowej klasy I (HDAC klasy I) tj. kwas walproinowy (VPA). Jako kontrolę zastosowano komórki linii prawidłowej NHEK. Zaobserwowano, iż VPA zwiększa efekt cytotoksyczny indukowany przez BMN-673 i DTIC. Ponadto, kwas walproinowy, DTIC jak i talazoparib zarówno samodzielnie jak i w kombinacji zwiększają liczbę pęknięć dwuniciowych w komórkach czerniaka. W celu wyjaśnienia mechanizmu/efektu dzięki któremu HDAC klasy I zwiększa czułość na dakarbazynę i talazoparib Doktorantka określiła poziom ekspresji siedem genów zaangażowanych w szlak naprawy pęknięć dwuniciowych (*RAD51*, *RAD51D*, *FANCD2*, *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *PARP1*) w komórkach czerniaka DMBC11. Zaobserwowano zmianę profilu w ekspresji mRNA *RAD51D*, *RAD51* i *FANCD2*, co potwierdzono na poziomie białka w przypadku dwóch ostatnich genów. W tej części recenzji mam prośbę o wyjaśnienie kryteriów wyboru genów oraz próbę wyjaśnienia zmian w poziomie ekspresji na poziomie mRNA i białka genów *RAD51* i *FANCD2*. U myszy NSG suboptymalne dawki BMN673, VPA i DTIC nie hamowały wzrostu komórek DMBC11 (podskórne ksenografty), jednak zaobserwowano efekt cytotoksyczny w przypadku stosowania BMN673 z DTIC oraz BMN673, DTIC i VPA. Wyniki badań wskazują na zasadność stosowanie układów skojarzonych opartych na związkach uwrażliwiających działanie leków jako jednej z możliwości rzutującej na skuteczność terapii przeciwnowotworowych.

W publikacja 3 (*Class I HDAC inhibition leads to a downregulation of FANCD2, RAD51 and eradication of glioblastoma cells*) wykazano obniżony poziom LIG4 w liniach pierwotnych glejaka wielopostaciowego, która tworząc kompleks z białkiem XRCC4 umożliwia ligację końców pęknięć dwuniciowych w szlaku NHEJ. Obniżony poziom ligazy może więc stymulować szlak alternatywny NHEJ i jego blokowanie Doktorantka przeanalizował z użyciem inhibitora PARP1 tj. BMN-673 w komórkach preinkubowanych z kwasem walproinowym. Etap ten miał na celu uwrażliwienie komórek na działanie zarówno inhibitora jak i czynnik alkilującego DNA tj. TMZ. Wyniki badań wskazują na działanie synergistyczne zastosowanej kombinacji związków chemicznych, co skutkowało śmiercią komórek glejaka na drodze syntetycznej letalności: zahamowanie podziału komórek w teście klonogennym oraz wzrostem pęknięć dwuniciowych oceniony testem kometowym (wersja neutralna) oraz poziomem fosforylacji histonu γ -H2AX. Zarówno uzyskane wyniki jak również ich dojrzała dyskusja w ramach publikacji świadczy o aplikacyjnym charakterze badań w kontekście nowych strategii onkologicznych.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Małgorzaty Drzewieckiej pt. *Inhibitory białek naprawy DNA jako potencjalne leki w*

spersonalizowanej terapii przeciwnowotworowej, opartej o syntetyczną letalność stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce.

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 w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie Pani mgr Małgorzaty Drzewieckiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Biorą pod uwagę szczególne walory aplikacyjne rozprawy, rzetelność przeprowadzonych i opublikowanych wyników badań oraz wyróżniające rozwiązanie problemu naukowego wnoszę do Komisji ds. Stopni Naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne Uniwersytetu Łódzkiego o wyróżnienie rozprawy Pani mgr Małgorzaty Drzewieckiej.

Michal Anielski