



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, 12.09.2023

Recenzja pracy doktorskiej mgr Małgorzaty Drzewieckiej

pt.: „Inhibitory białek naprawy DNA jako potencjalne leki w spersonalizowanej terapii przeciwnowotworowej, opartej o syntetyczną letalność”

wykonanej w Katedrze Genetyki Molekularnej Instytutu Biochemii
na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego

pod kierunkiem promotorów:

Prof. dr hab. Tomasza Śliwińskiego oraz Dr hab. n. med. Macieja Radka, prof. UMED

Ocena formalna i metodologiczna pracy

Ocena formalna

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Drzewieckiej stanowi zbiór trzech powiązanych tematycznie artykułów naukowych opublikowanych w latach 2022-2023; dwa z tych artykułów są pracami oryginalnymi, a jeden jest pracą przeglądową. Wszystkie publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w międzynarodowych wysoko punktowanych czasopismach i są opracowaniami zbiorowymi, w których Pani mgr Małgorzata Drzewiecka jest pierwszym autorem. Sumaryczny współczynnik oddziaływania publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wynosi 8,282, a punktacja MEiN wynosi 200 pkt.

W rozprawie doktorskiej zawarto także pozostały dorobek publikacyjny Doktorantki, na który składa się pięć 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 54,73, co w przeliczeniu na punktację MEiN wynosi 745 pkt. Całkowity dorobek publikacyjny

Pani mgr Małgorzaty Drzewieckiej 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 ogromny, przede wszystkim w wykonywaniu prac doświadczalnych. Wkład pracy mgr Małgorzaty Drzewieckiej został określony w każdej z dwóch prac oryginalnych na 66%, natomiast w pracy przeglądowej na 75%. Tak duży udział Doktorantki w opublikowanych pracach stanowi niezaprzecalnie podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora na podstawie przedstawionego cyklu prac.

Praca doktorska została wydana w formie oprawionego maszynopisu liczącego 87 stron i zawiera następujące rozdziały: źródła finansowania, współpraca naukowa i staże, spis publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, pozostały dorobek naukowy, komunikaty zjazdowe, staż naukowy, wprowadzenie, hipoteza, cel pracy, materiały i metody badawcze, wyniki, wnioski, literatura, streszczenie w języku polskim i angielskim, kopie publikacji wchodzących w zakres rozprawy doktorskiej oraz oświadczenia współautorów publikacji. Wprowadzenie stanowi ogólną analizę aktualnego stanu wiedzy na temat podjętego problemu badawczego uzasadniając celowość prowadzonych badań. W rozdziale tym w skrócie przedstawiono podstawowe informacje dotyczące syntetycznej letalności, systemów naprawy DNA w komórkach eukariotycznych, deacetylaz histonowych oraz znaczenia inhibitorów HDAC i PARP w terapii nowotworów. W następnych rozdziałach prawidłowo sformułowano hipotezy i cele pracy. Szczegółowe cele pracy zostały precyzyjnie przedstawione w trzech punktach i poprawność ich sformułowania również nie budzi wątpliwości. W kolejnym rozdziale wyszczególniono zastosowane materiały i metody, w tym jakie tkanki pobrano od pacjentów, zastosowane linie komórkowe i zwierzęta doświadczalne. W kolejnych rozdziałach Doktorantka sprawozdaje uzyskane wyniki badań i formułuje wnioski w trzech punktach.

Do pracy załączono kopie trzech opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych. Wyniki prac oryginalnych składające się na rozprawę doktorską zostały opublikowane w dwóch artykułach w anglojęzycznych czasopismach naukowych o wysokim współczynniku oddziaływania, co potwierdza ich wartość poznawczą i wysoki poziom naukowy pracy doktorskiej. Praca przeglądowa dobrze odzwierciedla aktualny stan wiedzy na temat syntetycznej letalności. Prace te były szczegółowo recenzowane i nie znajdują w nich błędów merytorycznych. W tym miejscu należy zauważyć, że w rozdziale Wyniki na stronie 22 oraz w opublikowanych oryginalnych artykułach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej nie

zawsze w sposób prawidłowy stosowano się do zasad zapisywania nazw genów; prawidłowo nazwy genów powinny być zapisywane kursywą. Jednakże, takie drobne błędy nie zmniejszają wysokiego poziomu merytorycznego przedstawionej do oceny pracy doktorskiej.

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 cel pracy w sposób poprawny. Głównym celem pracy była ocena skuteczności zastosowanego inhibitora HDAC (VPA- kwasu walproinowego) w skojarzeniu z inhibitorem PARP1 (BMN-673), HDAC i związku alkilującego na wyizolowanych z guzów litych (mózgu i skóry) liniach komórkowych. Doktorantka osiągnęła główny cel pracy realizując trzy następujące szczegółowe cele:

1. Pozyskanie komórek glejaka do hodowli *in vitro* z materiału pobranego od pacjentów
2. Analiza efektów komórkowych indukowanych przez inhibitor HDAC, PARP1 i związek alkilujący stosowanych samodzielnie i w kombinacji
3. Określenie zależności pomiędzy inhibicją deacetylaz histonów a odpowiedzią komórkową po ekspozycji na inhibitor PARP1 i związek alkilujący.

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 jednoznacznie 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 metody zostały bardzo szczegółowo opisane. W pracy zastosowano następujące metody: Western blot do analizy ekspresji białek, Real-Time PCR do analizy ekspresji genów, barwienie błękitem trypanu do badania przeżywalności komórek, test klonogenności do analizy zdolności proliferacyjnej komórek, analizę cytometryczną i neutralny test kometowy do badania akumulacji DSB oraz badanie cytometryczne apoptozy/nekrozy po utrwaleniu komórek i barwieniu Aneksyną V i PI. Zdecydowana większość z tych analiz została samodzielnie wykonana przez Doktorantkę.

Zastosowane metody zapewniły uzyskanie jednoznacznych wyników. W pracy zastosowano adekwatne dla rozwiązania problemów badawczych analizy statystyczne.

Dobór piśmiennictwa i umiejętność wykorzystania źródeł

Piśmiennictwo w jednej z opublikowanych oryginalnych prac obejmuje 22 pozycje, a w drugiej 40 pozycji. Piśmiennictwo w pracy przeglądowej obejmuje 85 pozycji literaturowych. Zaprezentowane piśmiennictwo jest właściwie dobrane i jest bezpośrednio związane z tematyką pracy. Doktorantka w sposób rzeczowy prezentuje swoje tezy wspierając się wynikami własnych badań oraz najnowszym piśmiennictwem.

Ocena merytoryczna pracy

Trafność problematyki badawczej i jej oryginalność

Obecnie terapie celowane molekularnie stanowią bardzo obiecującą formę terapii w onkologii, z którą wiąże się nadzieje na poprawę skuteczności leczenia i wydłużenie długości przeżycia pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem. W ostatnich latach coraz większe zainteresowanie wzbudza spersonalizowane podejście do terapii przeciwnowotworowej opartej na zjawisku syntetycznej letalności wykorzystującej inhibitory białek, mające na celu zablokowanie szlaków alternatywnych. W niniejszej pracy poszukiwano interakcji opartych na zjawisku syntetycznej letalności i inhibicji deacetylazy histonowej w połączeniu z inhibitorami PARP1 oraz związkami alkilującymi w komórkach guzów łitych – glejaka i czerniaka. 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 skuteczniejszej terapii spersonalizowanej w glejaku i czerniaku.

Materiałem badawczym wykorzystanym w eksperymentach w niniejszej pracy doktorskiej były dwie linie pierwotne glejaka wielopostaciowego oraz jedna linia pierwotna czerniaka. Jako kontrole do linii nowotworowych zastosowano komercyjnie dostępną linię komórek prawidłowych melanocytów dla komórek czerniaka oraz astrocytów dla komórek glejaka. W pracy przeprowadzono również eksperymenty *in vivo* na linii czerniaka DMBC11 z wykorzystaniem myszy NSG (NOD scid gamma). W ramach realizacji pracy doktorskiej wykazano, że inhibicja deacetylazy histonowej klasy I uwrażliwia komórki czerniaka i glejaka wielopostaciowego na działanie inhibitora PARP1 i związku alkilującego. Natomiast inkubacja komórek z badanymi związkami po wcześniejszej ekspozycji na kwas walproinowy, prowadziła do gromadzenia się większej liczby podwójnych pęknięć DNA (powyżej poziomu naprawy), zahamowania proliferacji komórek nowotworowych a także do indukcji apoptozy. Ponadto

inhibicja HDAC klasy I spowodowała obniżenie poziomu białek FANCD2, RAD51 we wszystkich badanych liniach komórkowych. Co więcej, zastosowanie inhibitora PARP1 w połączeniu z związkiem alkilującym nie wywoływało toksycznego efektu w prawidłowych melanocytach i astrocytach. Przeprowadzone eksperymenty *in vivo* na ksenograftach pierwotnej linii czerniaka DMBC11 w myszach NSG wykazały niemal całkowitą, redukcję masy guza po zastosowaniu kombinacji badanych związków.

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 zastosowanie kwasu walproinowego w połączeniu z inhibitorem PARP1 i związkiem alkilującym prowadzi do synergistycznego działania, co skutkuje m.in. zmniejszoną przeżywalnością, proliferacją a także indukcją apoptozy w komórkach czerniaka i glejaka, nie wpływając toksycznie na prawidłowe melanocyty i astrocyty. Co istotne, nigdy wcześniej nie przeprowadzono badań wskazujących na efekt synergistyczny wywołany przez inhibitory HDAC w komórkach nowotworowych. Ten aspekt pracy stanowi zatem element nowości i oryginalne osiągnięcie Doktorantki. Jednakże potwierdzenie powyższych obserwacji wymaga przeprowadzenia dalszych badań *in vitro* na większej liczbie linii nowotworowych oraz *in vivo*.

Znaczenie uzyskanych wyników dla nauki i praktyki

Uzyskane w ramach realizacji wyniki stanowią istotny wkład w dotychczasową wiedzę naukową dotyczącą opracowania terapii przeciwnowotworowej opartej o syntetyczną letalność. 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, terapia skojarzona inhibitorów PARP1, HDAC i związku alkilującego dała znacznie silniejszy efekt eradykacji badanych komórek czerniaka i glejaka, w porównaniu do pojedynczego zastosowania tych związków otwiera możliwości rozwoju skuteczniejszych terapii przeciwnowotworowych.

Wnioski Końcowe

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

Rozprawa doktorska pt.: „Inhibitory białek naprawy DNA jako potencjalne leki w spersonalizowanej terapii przeciwnowotworowej, opartej o syntetyczną letalność” 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 Małgorzaty Drzewieckiej 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

