



Łódź, 11 września 2023 r.

Prof. dr hab. n med. Paweł Parniewski

Pracownia Genetyki Molekularnej

IBM PAN

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Małgorzaty Drzewieckiej na temat:

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

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska podejmuje niezwykle istotną tematykę badawczą, dotyczącą mechanizmów naprawy podwójnych pęknięć DNA i syntetycznej letalności w kontekście spersonalizowanej terapii przeciwnowotworowej. Autorka rozprawy podjęła bardzo istotną tematykę z punktu widzenia leczenia nowotworów z wykorzystaniem inhibitorów HDAC, PARP a dodatkowo wykorzystanie strategii łączenia, obejmującej wyżej wymienione inhibitory i hamowanie głównych szlaków kontrolnych cyklu komórkowego może okazać się bardzo istotne w skojarzonych terapiach przeciwnowotworowych, wykorzystujących niestabilność genomu.

Praca doktorska stanowi podsumowanie i omówienie wyników badań Autorki opublikowanych w postaci dwóch prac eksperymentalnych i jednej pracy przeglądowej, które ukazały się w czasopiśmie, ujętych w tzw. Liście Filadelfijskiej.

Na układ pracy składają się:

1. Źródła finansowania, grant HARMONIA, którego kierownikiem był prof. dr hab. Tomasz Śliwiński, Promotor Doktorantki oraz InterDOC-STARt-Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie. Zabrakło w tej części, co jest dla recenzenta istotne, informacji o wysokości uzyskanych środków finansowych.

2. Współpraca naukowa. W kolejnej części Autorka rozprawy prezentuje nawiązaną Współpracę naukową, konieczną dla realizacji celów badań. Jest to współpraca z Kliniką Neurochirurgii i Chirurgii Nerwów Obwodowych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Pracownią Cytometrii Przepływowej Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Warszawie a także Temple University w Filadelfii. Patrząc na zakres i tematykę badań wchodzących w niniejszą rozprawę, dobór naukowych jednostek współpracujących był konieczny i właściwy.

3. Dorobek naukowy. Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej - jedna praca przeglądowa i dwie prace eksperymentalne, to dorobek bardzo dobry przy realizacji zadań, prowadzących do uzyskania stopnia doktora. Sumaryczny Impact Factor tych czasopism, wynoszący nieco ponad 11, to świadectwo wysokiej klasy prowadzonych badań, co niewątpliwie jest zasługą Doktorantki i Jej Promotorów. Dorobek ten oceniam bardzo wysoko.

4. Pozostały dorobek naukowy, to zestaw sześciu publikacji współautorskich o łącznym współczynniku IF 46.171. Ten element dorobku Pani mgr Małgorzaty Drzewieckiej oceniam również bardzo wysoko.

5. Komunikaty zjazdowe. Na tę część dorobku Doktorantki składa się 5 komunikatów, w których Doktorantka jest pierwszym autorem, prezentującym wyniki i 3 komunikatów, w których jest współautorem. Świadczy to o zaangażowaniu w prowadzenie badań naukowych i o umiejętności prezentowania publicznie uzyskanych przez siebie rezultatów.

7. Wprowadzenie. W tej części Autorka szczegółowo przedstawia tło naukowe dla podjęcia swoich badań i wskazuje na coraz większe znaczenie spersonalizowanej terapii przeciwnowotworowej opartej na zjawisku syntetycznej letalności. Jej uwagi na temat wykorzystania inhibitorów białek w celu zablokowania szlaków alternatywnych nakreślają bardzo obiecujące perspektywy skuteczności w leczeniu nowotworów. Aktualne dane literaturowe, na które powołuje się Doktorantka we Wprowadzeniu stały się przesłanką do podjętych badań dotyczących oceny efektu działania wybranych inhibitorów białek



naprawy podwójnych pęknięć w DNA oraz inhibitora HDAC w skojarzeniu ze związkami alkilującymi w liniach komórkowych glejaka i czerniaka. W tym rozdziale zabrakło mi jednak krótkiej charakterystyki zastosowanych inhibitorów.

6. Cel pracy. Cele pracy zostały przedstawione prawidłowo, w postaci celu głównego i trzech głównych zadań badawczych, mających na celu: 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

7. Materiały i metody. Zastosowane materiały i metodyka badawcza są dobrze opisane. Doświadczenia były prowadzone na pierwotnych liniach komórkowych wyizolowanych z guzów litych od pacjentów w III i IV stadium zaawansowania czerniaka bądź glejaka wielopostaciowego. Jako kontrole do linii nowotworowych zastosowano odpowiednie komercyjnie dostępne linie komórek prawidłowych wywodzące się z tych samych co komórki nowotworowe tkanek w postaci melanocytów NHEM (ang. Normal Human Epidermal Melanocytes) dla komórek czerniaka i astrocytów NHA (ang. Normal Human Astrocytes) dla komórek glejaka. Spektrum metodyki badawczej w niniejszej rozprawie jest bardzo szerokie. Począwszy od samodzielnie przez Doktorantkę wyprowadzenia linii komórkowych z guzów litych, izolacji całkowitego RNA i mRNA, oznaczenia ekspresji na poziomie mRNA i białek, wykonania analiz z wykorzystaniem cytometrii przepływowej (ocena poziomu apoptozy/nekrozy, analiza cyklu komórkowego, fosforylacja histonu γ -H2A.X). Całość pokazuje, że Doktorantka posiada znajomość bardzo zróżnicowanej palety metod, koniecznej dla realizacji postawionych celów badawczych, co oceniam bardzo wysoko.

8. Wyniki zostały omówione skrótowo, podsumowując główne rezultaty uzyskane w ramach przeprowadzonych badań. Jest to zrozumiałe, ze względu na to, że pełne spektrum analiz zostało szczegółowo omówione w publikacjach naukowych wchodzących w rozprawę doktorskiej. Wyniki są interesujące i warte upowszechnienia. Noszą znamiona nowości i stanowią istotny wkład w rozwój danej dziedziny badań.

10. Wnioski zostały przedstawione w sposób precyzyjny i wynikają z prawidłowo przeprowadzonych badań, które pozwoliły stwierdzić, że:

1. Inhibicja HDAC klasy I spowodowała zahamowanie naprawy dwuniciowych pęknięć w DNA przez rekombinację homologiczną w wyniku obniżenia ekspresji RAD51 i FANCD2 co uwrażliwiło komórki na związki alkilujące wprowadzające cytotoksyczne uszkodzenia i w konsekwencji powodując syntetycznie letalną interakcję z inhibitorem PARP1 - BMN-673
2. Akumulacja dwuniciowych pęknięć w DNA skutkowała istotnym zmniejszeniem zdolności proliferacyjnych komórek oraz indukcję apoptozy.
3. 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

Jedynie czego mi zabrakło to przedstawienia mocnych stron i ograniczeń badania. Jestem także ciekaw dalszego kierunku badań.

11. Literatura uzupełniająca to lista publikacji sugerowanych czytelnikowi i cytowanych w rozprawie przez Doktorantkę. Zawiera głównie prace z ostatnich 20 lat, dotyczących zagadnień powiązanych z mechanizmami naprawy DNA, syntetycznej letalności, spersonalizowaną terapią przeciwnowotworową i odniesień do stosowanej metodyki badawczej.

12. Następnie Autorka przedstawia tekst **Rozprawy w języku angielskim** oraz

13. Publikacje będące podstawą rozprawy doktorskiej. Nie mam zastrzeżeń do tych części pracy.



14. Oświadczenia o udziale w publikacjach. We wszystkich przedstawionych publikacjach udział Doktorantki był wiodący, wynosił 66-70% i obejmował zaplanowanie prac, realizację części doświadczalnej, przygotowanie rycin i tabel, opracowanie i interpretację wyników oraz przygotowanie manuskryptu.

15. Autorka uzyskała również wymagane **oświadczenia od współautorów**, potwierdzające Jej udział jako głównego Autora prac.

Podsumowując, należy stwierdzić, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Małgorzaty Drzewieckiej, 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.

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

Jednocześnie, doceniając wkład Doktorantki w rozwój badań o potencjale klinicznym, złożoność stosowanych metod badawczych oraz szczególne walory poznawcze i aplikacyjne 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

Z poważaniem,