



Dr hab. Teresa Kral

Wrocław, 07.03.2023 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej Mgr Patrycji Marty Gralewskiej zatytułowanej:
„Terapia celowana oparta na zwiększeniu wrażliwości komórek raka jajnika na olaparib
poprzez zastosowanie inhibitorów białek regulujących stres replikacyjny wywołany
pęknięciami nici DNA”.**

Praca doktorska została wykonana w Katedrze Biofizyki Medycznej Instytutu Biofizyki
Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem Pani Dr hab. Anety Rogalskiej, Prof. UŁ.

Przedstawiona do oceny rozprawa składa się z trzech prac:

1. **Gralewska P.**, Gajek A., Marczak A., Rogalska A. Participation of the ATR/CHK1 pathway in replicative stress targeted therapy of high-grade ovarian cancer. *J Hematol Oncol.* 2020, 13, 39.
2. **Gralewska P.**, Gajek A., Marczak M., Mięka M., Ostrowski J., Śliwińska A., Rogalska A. PARP inhibition increases the reliance on ATR/CHK1 checkpoint signaling leading to synthetic lethality-an alternative treatment strategy for epithelial ovarian cancer cells independent from HR effectiveness. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21(24), 9715.
3. **Gralewska P.**; Gajek A.; Rybaczek D.; Marczak A.; Rogalska A. The Influence of PARP, ATR, CHK1 Inhibitors on Premature Mitotic Entry and Genomic Instability in High-Grade Serous BRCAMUT and BRCAWT Ovarian Cancer Cells. *Cells* 2022, 11, 1889.

Praca nr 1 to praca przeglądowa, prace nr 2 i nr 3 to oryginalne prace badawcze. Wszystkie prace są w języku angielskim i zostały opublikowane w latach 2020-2022, w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym z sumarycznym Impact Factor (IF) wynoszącym 28,004 co odpowiadało 420 punktom MNiSW w latach publikacji.



Wszystkie prace mają charakter współautorski a udział Pani Mgr Patrycji Marty Gralewskiej, zgodnie z załączonymi oświadczeniami współautorów, jest wyraźnie określony na 50% w każdej z trzech prac wchodzących w skład osiągnięcia. Udział Doktorantki obejmuje wszystkich etapy pracy naukowej, począwszy od tworzenia koncepcji prezentowanych prac poprzez udział w wykonaniu części eksperymentów dotyczących min. oceny cytotoksyczności badanych związków, oceny poziomu uszkodzeń w obrębie jedno- i dwuniciowego DNA, poprzez ocenę przeżywalności badanych linii komórkowych, tempa ich proliferacji aż po ocenę rozkładu faz cyklu komórkowego, analizę zmian apoptotycznych i ich zmian morfologicznych. Pani Mgr Patrycja Marta Gralewska brała udział w opracowaniu wyników, ich analizie statystycznej i interpretacji oraz była współtwórcą strony graficznej uzyskanych wyników oraz manuskryptów prac stanowiących osiągnięcie.

Do cyklu publikacji Pani Mgr Patrycja Marta Gralewska dołączyła 22 stron opracowania autorskiego w języku polskim. Opracowanie obejmuje następujące rozdziały: streszczenie uzyskanych wyników w języku polskim i angielskim, wprowadzenie wraz z jasno określonym głównym celem pracy i celami szczegółowymi, materiały i metody badawcze, omówienie wyników, ich szczegółowe podsumowanie i wnioski.

W opracowaniu autorskim rozprawy doktorskiej zamieszczona jest również lista pozostałych 4 prac z dorobku Doktorantki opublikowanych w czasopismach z listy JCR. Pani Mgr Patrycja Marta Gralewska jest także współautorem, 6 prezentacji ustnych oraz 8 komunikatów zaprezentowanych na zagranicznych i krajowych konferencjach naukowych. W ramach działalności naukowej, Mgr Patrycja Marta Gralewska sprawowała także opiekę nad częścią eksperymentalną pracy magisterskiej Pani Natalii Górnej, studentki kierunku Biologia na Wydziale BiOŚ UŁ. Przedstawione osiągnięcia naukowe Doktorantki świadczą o ciągłym i wszechstronnym pogłębianiu doświadczenia naukowego.

Doktorantka może też poszczycić się osiągnięciami w dziedzinie działalności popularyzacyjno-naukowej. Pani Mgr Patrycja Marta Gralewska jest od roku 2019 członkiem trzech towarzystw naukowych, w sumie brała udział w 11 kursach/szkoleniach/konferencjach dotyczących, które dotyczyły min. najnowszych technik pomiarowych z wykorzystaniem metody Western Blotting, metod hodowli komórek w 3D oraz znaczenia jakości wody w analizie białek. Stanowi



to dodatkowy aspekt gromadzenia doświadczeń, które są ważne w poszerzaniu warsztatu badawczego i metodologicznego Doktorantki. Pani Mgr Patrycja Marta Gralewska jako członek Komitetu Naukowego Sekcji Biologia Molekularna i Medyczna wzięła udział w organizacji VI Ogólnopolskiej Konferencji Doktorantów Nauk o Życiu BIOOPEN oraz uczestniczyła w warsztatach popularyzujących naukę.

Prowadząc swoje badania naukowe, Pani Mgr Patrycja Marta Gralewska podjęła bardzo istotną tematykę z punktu widzenia strategii leczenia nowotworów z wykorzystaniem inhibitorów PARPi. Obecnie inhibitory PARP są zatwierdzone do leczenia raka jajnika, piersi, jajowodu, trzustki i prostaty związanego z mutacją BRCA jako leczenie drugiego rzutu, a coraz częściej także pierwszego rzutu. Niestety, coraz większa liczba pacjentów nabywa oporność na inhibitor PARP po dłuższym czasie leczenia. Najnowsze prace sugerują, że terapia skojarzona ukierunkowana na punkty kontrolne cyklu komórkowego i PARPi działa synergistycznie tak aby zwiększy liczbę błędów DNA, powodując w ten sposób wzrost śmiertelności komórek nowotworowych z niedoborem naprawy DNA lub całkowitą opornością na inhibitor PARP. Wydaje się zatem jak najbardziej na czasie, konieczność bardziej kompleksowego poznania i zrozumienia oddziaływań, które modulują punkty kontrolne cyklu komórkowego. Dodatkowo, wykorzystanie strategii łączenia, obejmującej inhibitory PARP i hamowanie głównych szlaków kontrolnych cyklu komórkowego może okazać się bardzo istotne w skojarzonych terapiach przeciwnowotworowych, wykorzystujących niestabilność genomu. Zatem, wyniki badań przedstawione w pracy doktorskiej Pani Mgr Patrycji Marty Gralewskiej, dotyczące możliwości zwiększenia wrażliwości komórek jajnika na olaparib, przez zastosowanie białek regulujących stres replikacyjny, wpisują się w najbardziej aktualny nurt badań terapii celowanych na co zwraca uwagę sama Doktorantka definiując cel swojej pracy.

Przechodząc do meritum, rozprawa doktorska Pani Mgr Patrycji Marty Gralewskiej dotyczy oceny cytotoksycznego efektu działania inhibitorów kinazy ATR i CHK1 w skojarzeniu z inhibitorem polimerazy poli(ADP-rybozy) (PARP, olaparib) w oddziaływaniu z trzema liniami komórkowymi raka jajnika – SKOV-3, OV-90 oraz PEO-1 – ze sprawnym jak i uszkodzonym systemem rekombinacji homologicznej.



Główną częścią, przedstawionej rozprawy doktorskiej, jest zbiór trzech, spójnych tematycznie, współautorskich artykułów naukowych. Wszystkie prace podlegały już procesowi recenzowania naukowego zatem skupię się na analizie doboru prac w zaprezentowanym osiągnięciu naukowym jakim jest rozprawa doktorska. Załączone prace dokumentują kolejne etapy pracy naukowej Pani Mgr Patrycji Marty Gralewskiej, na które składały się:

1. Analiza najnowszych doniesień literaturowych (praca 1) związanych z tematyką pracy doktorskiej oraz co bardzo ważne, zaproponowanie przez Doktorantkę modelu możliwej odpowiedzi komórek raka jajnika na inhibitory stresu replikacyjnego oraz ich skojarzone działanie z PARPi.
2. Wykazanie, że cytotoksyczne działanie inhibitora PARP można zwiększyć poprzez równoczesną inhibicję białek zaangażowanych w regulację punktów kontrolnych cyklu komórkowego poprzez zastosowanie terapii skojarzonej dla układów PARP+ATRi /PARPi+CHK1i (praca 2). Skuteczność kombinacji PARPi/ATRi i PARPi/CHK1i była różna, jednakże każda z tych kombinacji była znacznie skuteczniejsza niż monoterapia. Co więcej terapia skojarzona okazała się, co wykazała Doktorantka, bardziej cyto- i genotoksyczna dla komórek raka jajnika niezależnie od obecności genu BRCA.
3. Szczegółowe omówienie mechanizmu śmierci komórkowej jako rezultatu akumulacji aberracji chromosomowych i niestabilności genomu; indukowanych zarówno przez obecność badanych związku w początkowej fazie odpowiedzi komórek na olaparib jak i inhibitorów szlaku ATR/CHK (praca 3).
4. I wreszcie, co uważam za bardzo cenne, załączenie kolejnych, jeszcze nie publikowanych danych, które wskazują kierunek dalszych badań. Wyniki tych badań sugerują, że inhibitory nie zwiększają ekspresji białka będącego indykatorem oporności wielolekowej, zarówno w mono terapii, jak i w terapii skojarzonej, zatem mogą być stosowane zarówno w przypadku nowotworów pierwotnych, jak i opornych na inhibitory PARP.

Uważam za godne podkreślenia wszystkie aspekty prowadzonych badań: ich konsekwencję i przejrzystość, dzięki czemu udało się uzyskać potwierdzenie hipotezy badawczej, że cytotoksyczne działanie inhibitora PARP można zwiększyć poprzez zastosowanie terapii skojarzonej. Należy też podkreślić, że Pani Mgr Patrycja Marta Gralewska deklaruje



samodzielność wykonania większości badań, co świadczy o jej dojrzałości i samodzielności naukowej. Wyniki prezentowane w ramach osiągnięcia naukowego przyczyniają się do głębszego poznania i zrozumienia mechanizmu w wyniku którego generowane są efekty synergiczne między hamowaniem punktu kontrolnego cyklu komórkowego a PARPi, co w perspektywie otwiera nowe możliwości wykorzystania tych metod leczenia nowotworów w warunkach badań klinicznych.

Podczas lektury pracy doktorskiej nasunęły mi się następujące uwagi i pytania.

1. Opracowanie jest napisane w sposób bardzo zwięzły i rzeczowy. Bardzo dobrze opracowany wstęp, jasno zdefiniowane cele i wnioski. Przejrzysta i estetyczna forma opracowania zarówno tekstu jak i rysunków sprawia, że całość czyta się bardzo dobrze.
2. Nie mam uwag do strony edytorskiej poza jedną, poniżej:
W pracy: Gralewska P., Gajek A., Marczak M., Mikuła M., Ostrowski J., Śliwińska A., Rogalska A. PARP inhibition increases the reliance on ATR/CHK1 checkpoint signaling leading to synthetic lethality-an alternative treatment strategy for epithelial ovarian cancer cells independent from HR effectiveness. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21(24), 9715; <https://doi.org/10.3390/ijms2124971>. Umieszczony odnośnik DOI nie jest poprawny, należałoby go zastąpić: <https://doi.org/10.3390/ijms21249715>.
3. Podczas lektury nasunęła mi się wątpliwość, którą może warto wziąć pod uwagę w dalszych badaniach z wykorzystaniem znaczników fluorescencyjnych. Zarówno Hoechst33258 jak też i jodek propidyny (PI), są znacznikami standardowo stosowanymi w protokołach obrazowania fluorescencyjnego zmian apoptotycznych i nekrotycznych komórek. Jednakże coraz więcej doniesień naukowych sugeruje, w tym najnowsze (<https://doi.org/10.1038/s42003-020-01241-4>), że obecność cząsteczek Hoechst 33258 w znacznym stopniu destabilizuje parowanie zasad sąsiadujących z jego miejscem wiązania w obrębie cząsteczki DNA. W konsekwencji obrazowanie komórek będących w fazie wczesnej i późnej apoptozy, może nie być efektem jedynie oddziaływania badanych związków/układów. Może na przyszłość warto zastosować znaczniki fluorescencyjne, które nie destabilizują w tak znaczący sposób nici DNA jak czyni to Hoechst 33258.



4. Mam także pytanie: Czy prowadzone były badania cytotoksycznego efektu działania inhibitorów kinazy w skojarzeniu z inhibitorem polimerazy PARP na komórkach normalnych jajnika? Ten aspekt badań wydaje się bardzo ważny dla zminimalizowania nakładającej się toksyczności przy jednoczesnym utrzymaniu skuteczności leku.

Reasumując, rozprawa doktorska Pani Mgr Patrycji Marty Gralewskiej pt. „Terapia celowana oparta na zwiększeniu wrażliwości komórek raka jajnika na olaparib poprzez zastosowanie inhibitorów białek regulujących stres replikacyjny wywołany pęknięciami nici DNA”, stanowi znaczący wkład w zrozumienie interakcji, które modulują punkty kontrolne cyklu komórkowego w celu określenia możliwości ich zastosowania w nowych, skojarzonych terapiach przeciwnowotworowych wykorzystujących niestabilność genomu.

Praca wskazuje na szeroką wiedzę Doktorantki w zakresie medycyny, biologii i biochemii oraz umiejętność prowadzenia pracy naukowej, począwszy od etapu planowania, poprzez wykonanie zadań badawczych, aż do opracowania i interpretacji wyników. Rozprawa doktorska składa się z trzech publikacji, z których wszystkie ukazały się w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Rozprawa doktorska jest spójna pod względem merytorycznym i redakcyjnym. Zaprezentowane wyniki mogą być podstawą do dalszych dyskusji i badań dotyczących identyfikacji i opisu mechanizmów odporności w celu zapewnienia dobrze tolerowanych a zarazem skutecznych strategii terapeutycznych, stosowanych w biomedycynie. Mając na uwadze powyższe stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa odpowiada wymogom stawianym pracom doktorskim zgodnie z Ustawą z dnia 20 lipca 2018 r - Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce, art. 187 (Dz. U. z 2022, poz. 574).

Zwracam się zatem uprzejmie do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne z wnioskiem o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani Mgr Patrycji Marty Gralewskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Dr hab. Teresa Kral

Wrocław, 07.03.2023