

Dr hab. n. farm. Sylwia Flis, prof. NIL

Narodowy Instytut Leków

w Warszawie

Warszawa, 15-03-2020 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Moniki Toma

pt. „Syntetyczna letalność w komórkach nowotworowych indukowana inhibitorami białek naprawy pęknięć DNA”

Choroby nowotworowe stanowią dużą grupę chorób cywilizacyjnych spowodowanych nagromadzeniem mutacji nadających niosącym je komórkom nieograniczony potencjał replikacyjny przez co komórki nowotworowe zamiast różnicować się w charakterystyczne dla danej tkanki komórki dzielą się w sposób niekontrolowany. Przyczyną tych mutacji mogą być utrwalone endogenne uszkodzenia DNA czy nienaprawione bądź nieprawidłowo naprawione błędy replikacyjne (mutacje spontaniczne); lub wprowadzone w wyniku pewnych infekcji wirusowych czy działania na komórki kancerogenów w postaci promieniowania jonizującego lub substancji genotoksycznych (mutacje indukowane). Mutacje kancerogenne dotyczą genów supresorowych (mutacje recesywne) lub protoonkogenów (mutacje dominujące). Geny te stanowią około 1% wszystkich genów, a kodowane przez nie białka są czynnikami wzrostowymi lub transkrypcyjnymi bądź są odpowiedzialne za przekazywanie sygnałów w komórce, kontrolę cyklu komórkowego, indukcję apoptozy czy bezpośrednio naprawę uszkodzeń DNA. Zatem już proces inicjacji kancerogenezy jest pośrednio bądź bezpośrednio zależny od wystąpienia niestabilności genetycznej. Zjawisko to umożliwia także promocję nowotworzenia poprzez aktywację kolejnych onkogenów, a nagromadzanie dodatkowych mutacji powoduje powstanie zmian fenotypowych prowadzących do dalszej progresji kancerogenezy, czyli „uzłośliwienia nowotworu”. Zjawisko niestabilności genetycznej jest również odpowiedzialne za powstawanie heterogennej populacji komórek w obrębie guza oraz za „wymykanie się” nowotworów leczeniu czy ich nawrót, pomimo stosowanej chemioterapii, w wyniku nabywania przez komórki nowotworowe oporności na stosowane chemioterapeutyki. Pomimo wymienionych benefitów dla komórek nowotworowych związanych z występującą w nich niestabilnością genetyczną, trzeba pamiętać, że jest to miecz obosieczny i po przekroczeniu pewnego progu zjawisko to powoduje szybko postępującą destabilizację genomu skutkującą zaburzeniem funkcji życiowych i śmiercią komórek. Fakt, że komórki nowotworowe mają podwyższony poziom mutagenezy wykorzystuje się obecnie w leczeniu farmakologicznym nowotworów np. przy użyciu czynników alkilujących, które powodują powstawanie uszkodzeń w DNA. Terapia ta zakłada, że mechanizmy naprawy DNA w komórkach prawidłowych będą wystarczająco wydajne by sobie z tym poradzić, podczas gdy w komórkach nowotworowych wydolność systemów naprawy DNA będzie przekroczona i tym samym tempo mutagenezy osiągnie poziom krytyczny powodujący śmierć komórek nowotworowych. Niestety podejście to, choć skuteczne w wielu przypadkach, ma znamiona wyboru mniejszego zła, gdyż tego typu chemioterapia nie tylko powoduje toksyczność ogólnoustrojową, ale paradoksalnie jednym z jej efektów ubocznych może być wywołanie u pacjenta innych nowotworów w wyniku zaindukowania powstania onkogennych mutacji w przypadkowych komórkach prawidłowych. Z tego względu (obniżenie natężenia i/lub częstości

występowania efektów ubocznych) oraz aby zminimalizować ryzyko wystąpienia lekooporności coraz częściej jest rekomendowane zastosowanie terapii skojarzonych z użyciem dwóch lub więcej leków o odmiennym mechanizmie działania, które wykazują addytywny lub najlepiej synergistyczny efekt umożliwiający nie tylko skuteczną terapię, ale także obniżenie dawek poszczególnych chemioterapeutyków.

Ze względu na różnorodność występujących nowotworów, a także odmienną odpowiedź na leczenie, nawet wśród podobnych morfologicznie nowotworów, wciąż istnieje zapotrzebowanie na poprawę skuteczności istniejących terapii oraz opracowywanie nowych metod leczenia. Jednym z nowych podejść terapeutycznych jest terapia spersonalizowana, w której leczenie jest oparte o wcześniejszą analizę/charakterystykę konkretnego nowotworu u danego pacjenta przy użyciu metod biologii molekularnej. Bazując na tym podejściu podejmowane są próby wprowadzenia do kliniki leczenia wykorzystującego zjawisko syntetycznej letalności (ang. *synthetic lethality*). Pierwotnie terminem syntetyczna letalność określano interakcję genetyczną dwóch lub więcej genów, których pojedyncze unieczynnienie poprzez delecję, dysrupcję bądź mutację punktową typu utraty funkcji nie powodowało znaczących efektów fenotypowych, natomiast ich wspólne występowanie powodowało śmierć komórki. Z czasem pojęcie to rozszerzono o zmiany epigenetyczne wpływające na ekspresję konkretnych genów, a ostatnio zaadoptowano również na potrzeby sytuacji fizjologicznego nokautu genu na poziomie transkrypcji poprzez blokowanie promotora, na etapie translacji poprzez degradację lub blokowanie powstałego mRNA (np. przy użyciu zjawiska interferencji RNA) bądź ostatecznie na poziomie białka poprzez hamowanie jego aktywności przy użyciu drobnocząsteczkowych inhibitorów. Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Moniki Toma wpisuje się w ten nowoczesny nurt badań. Jej celem było sprawdzenie potencjalnych możliwości terapeutycznych zastosowania inhibitorów białka PARP1 (*poly [ADP-ribose] polymerase 1*), tj. olaparybu (AZD2281) i talazoparybu (BMN673) w leczeniu odpowiednio czerniaka (łac. *melanoma malignum*) i glejaka wielopostaciowego (łac. *glioblastoma*) o obniżonej ekspresji genu *LIG4* kodującego ligazę IV DNA (LIG4). W komórkach ssaczy dominującą drogą naprawy dwuniciowych pęknięć w DNA jest niehomologiczne łączenie końców, w skrócie NHEJ (ang. *nonhomologous end joining*). W komórkach występuje kanoniczne NHEJ (cNHEJ, *canonical NHEJ* lub *classical NHEJ*) polegające na łączeniu chronionych końców DNA i którego elementem jest LIG4 oraz zależne od PARP1 alternatywne NHEJ (alt-NHEJ, *alternative NHEJ*) wymagające recesji 5' końców i bazujące na mikrohomologii (5-25 bp) sekwencji, stąd również zwane MMEJ (ang. *microhomology-mediated end joining*). Hipoteza robocza pracy doktorskiej zakładała zatem wykorzystanie nowotworowych linii komórkowych z endogennie upośledzonym jednym z mechanizmów naprawy uszkodzeń DNA oraz kondycyjne upośledzenie jednego z alternatywnych szlaków poprzez podanie odpowiedniego inhibitora, a spodziewanym efektem było uzyskanie, w „nowoczesnym rozumieniu” tego terminu, syntetycznej letalności wynikającej z przekroczenia w komórce nowotworowej naprawialnego poziomu uszkodzeń DNA. Celem podjętej przez Doktorantkę pracy była empiryczna confirmacja lub falsyfikacja tejże hipotezy. Jak wspomniano wcześniej, tematyka pracy jest aktualna i wpisuje się w bieżący trend poszukiwania nowych metod leczenia nowotworów opartych o terapię spersonalizowaną. Warto również podkreślić, że atrakcyjność zastosowania metod opierających się na wywołaniu zjawiska syntetycznej letalności wynika nie tylko z ich potencjalnej skuteczności, ale także na zakładanej wysokiej specyficzności tych metod wobec komórek docelowych ograniczającej efekty

uboczne. Z tego względu celowość podjętego tematu badań jest w pełni uzasadniona i ważna nie tylko z poznawczego, ale także z praktycznego punktu widzenia.

Praca doktorska mgr Moniki Toma została wykonana w Katedrze Genetyki Molekularnej na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem Prof. dr hab. Tomasza Śliwińskiego. Podstawą rozprawy jest pięć publikacji: 2 prace eksperymentalne i 3 prace przeglądowe; o łącznym współczynniku oddziaływania $IF \approx 21,1$. Jedna z prac przeglądowych została opublikowana w języku polskim, a pozostałe prace są zamieszczone w czasopismach anglojęzycznych. Warto zaznaczyć, że obie prace doświadczalne są opublikowane w cenionym czasopiśmie specjalistycznym „Oncotarget” o $IF > 5$, a doktorantka jest pierwszym autorem jednej z prac i, bazując na oświadczeniach współautorów, wraz z Panią prof. dr hab. n. med. Małgorzatą Czyż równorzędnym pierwszym autorem drugiej z prac doświadczalnych. Ponadto Doktorantka jest współautorem licznych prac naukowych, które nie wchodzą w skład przedstawionej do recenzji dysertacji. Korzystając z dorobku publikacyjnego i możliwości określonych w aktualnie obowiązującej ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym Doktorantka przygotowała pracę nie w formie klasycznej monografii, lecz jako zszywkę publikacji opatrzoną streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz wykazem dorobku naukowego i oświadczeniami współautorów. Rozdział „Streszczenie” podzielony jest na podrozdziały i dotyczy głównie wyników prac doświadczalnych, co jest logicznym rozwiązaniem ze względu na eksperymentalny charakter wykonanej pracy doktorskiej. Z tego względu dalsza część niniejszej recenzji również skupiać się będzie na „Streszczeniu” i wynikach prac opublikowanych w „Oncotarget”. Obie prace zostały opublikowane w recenzowanym czasopiśmie, co ułatwia pracę recenzentowi ☺, a przedstawione uwagi nie mają na celu umniejszania wagi otrzymanych wyników, lecz powinny być traktowane jako wskazówki, których zastosowanie mogłoby jeszcze podnieść ich wartość lub ułatwić odbiór czytelnikowi.

Rozdział „Streszczenie” zawiera kolejno wszystkie wymagane elementy, tj. Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Podsumowanie i wnioski oraz Literaturę. Układ podrozdziałów jest więc klasyczny, a co za tym idzie logiczny i przejrzysty. „Wstęp” zgodnie ze swoim przeznaczeniem wprowadza czytelnika w tematykę pracy, podkreśla znaczenie prowadzonych badań i uzasadnia cele pracy. Wymienione są podstawowe szlaki komórkowe naprawy dwuniciowych pęknięć w DNA, takie jak rekombinacja homologiczna (HR, *homologous recombination*) oraz kanoniczny i alternatywny NHEJ. Zabrakło mi jednak ich nieco szerszego omówienia, nawet choćby w postaci schematu lub tabelki wyliczającej biorące w nich udział białka i podsumowującej występujące pomiędzy szlakami różnice oraz wynikające z ich zastosowania konsekwencje dla komórki. Nie są to bowiem całkowicie równoważne szlaki, które mogą się swobodnie w pełni zastępować, choć mają ten sam nadrzędny cel, tj. przywrócenie ciągłości cząsteczki DNA, i mogą w pewnym zakresie nawzajem buforować swoje deficyty, to mają jednak nieco inny mechanizm i tym samym skutki działania: np. zarówno HR jak i niewymieniony w pracy szlak SSA (ang. *single-strand annealing*) opierają się na recesji 5' końców DNA, ale o ile naprawa przy użyciu pierwszego szlaku jest zazwyczaj bezbłędna, to efektem drugiego jest powstanie dużych delecji. Zabrakło mi również krótkiej charakterystyki użytych w pracy inhibitorów PARP1. Rozumiem, że jest to streszczenie opublikowanych prac, ale należy uwzględnić to, że publikacje mają swoją specyfikę wynikającą np. z narzuconego przez wydawcę limitu stron i faktu, że kierowane są głównie do specjalistów z danej dziedziny, natomiast w dysertacji, w mojej opinii, rozdział ten powinien mieć charakter rozszerzonego autoreferatu autora, który w przystępny sposób przedstawia osiągnięte wyniki i

zachęca do szczegółowego zapoznania się z nimi także odbiorców luźniej związanych z tematyką prezentowanych publikacji.

Podrozdział „Cel pracy”, choć pozornie najprostszy do recenzji, sprawił mi najwięcej problemów. Wynika to częściowo z niezdecydowania Doktorantki, która zarówno w wersji polskiej jak i angielskiej zaczęła treść rozdziału w czasie przeszłym dokonanym, a zakończyła w czasie przyszłym. Niemniej cel został jasno zdefiniowany i podzielony na trzy logiczne etapy. Zastrzeżenia może tylko budzić pierwszy punkt ze względu na niedbałość edytorską (początek zdania sugeruje izolację od pacjentów wielu linii komórkowych, a koniec, że praca odbywać się będzie tylko na jednej...) oraz na fakt, że Doktorantka otrzymała do dyspozycji już wyizolowane i wstępnie scharakteryzowane linie komórkowe. Dlatego punkt ten powinien być przereklamowany np. do postaci: „Dalsza charakterystyka genetyczna wybranych pierwotnych linii nowotworowych”. O ile punkty 1 i 2 mają charakter pomocniczy, to punkt 3 stanowi właściwy cel pracy, czyli ocenę skuteczności zastosowanych inhibitorów PARP1 na wyizolowanych z guzów litych liniach komórkowych.

„Materiały i metody” 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. Warto tu zwrócić uwagę na dwa aspekty. Po pierwsze komórki nowotworowe i prawidłowe hodowane były w innych podłożach. Jest to metoda praktykowana ze względu na różne wymagania komórek, a także ze względów finansowych – czynniki wzrostowe są bardzo kosztowne i jeśli jakaś linia ich nie potrzebuje, to z oszczędności się je pomija w medium hodowlanym. Używanie innych pożywek wiąże się jednak z tym, że do układu doświadczalnego wprowadzane są dodatkowe zmienne utrudniające interpretację wyników. Optymalnym układem jest taki, w którym komórki kontrolne rosną w takiej samej pożywce co komórki badane, zatem mamy w układzie tylko pojedynczą zmienną np. genotyp komórek lub podaną substancję czynną. W przypadku pracy na liniach nowotworowych często udaje się taki układ uzyskać, gdyż komórki nowotworowe zazwyczaj mają konstytutywnie aktywowane pewne szlaki przekazywania sygnałów lub same produkują i wydzielają autokrynnie niektóre z potrzebnych czynników wzrostowych. Z tego względu wystarczają im pożywki uboższe od tych dla komórek prawidłowych, niemniej zazwyczaj dobrze się do nich adaptują. Drugi aspekt stanowi praca na pierwotnych liniach nowotworowych zwłaszcza hodowanych w postaci sferoidów, np. melanosfer zastosowanych przez Doktorantkę w hodowli komórek czerniaka. Zaletą takiego układu jest lepsze odwzorowanie warunków panujących w guzie u pacjenta. Z drugiej strony fakt posiadania w hodowli heterogennej populacji komórek (a nawet hodowli tylko wzbogaconej w komórki nowotworowe...) lub komórek o różnej dostępności do pożywki i podawanych substancji czynnych w przypadku hodowli 3D powoduje, że uzyskiwane odpowiedzi komórek są mniej zgodne, a tym samym, co trzeba mieć na uwadze, zazwyczaj mniej spektakularne, gdyż wynik jest uśrednioną wartością otrzymywaną z niejednorodnej populacji. W pracy zastosowano metody *in silico* (analiza wyników z dostępnych publicznie baz danych), *in vitro* (doświadczenia na liniach komórkowych i analizy molekularne), a nawet *in vivo* (wstępne doświadczenie z wykorzystaniem ksenografów). Użyte metody są nowoczesne, powszechnie akceptowane i należą zarówno do technik rutynowo używanych w wielu laboratoriach biologii molekularnej (np. Western blot),

jak i bardziej specjalistycznych (np. badanie utraty heterozygotyczności LOH, ang. *loss of heterozygosity*). Metody zastosowano zgodnie z ich przeznaczeniem i odpowiednio do potrzeb, czy stawianych celów. Komentarza wymaga tylko wspomniana przez Doktorantkę metoda wyznaczania synergii w działaniu dwóch związków przy użyciu dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA (ang. *two-way ANOVA*), choć chyba nie ma w będących podstawą tej dysertacji pracach wzmianki o addytywnym czy synergistycznym efekcie zastosowania dwóch substancji czynnych, a użyte określenia są typu „znacznie bardziej toksyczny efekt” (str. 25). Doktorantka powołuje się na pracę Slinker’a z 1998 r., która dopuszcza stosowanie wspomnianej metody. Należy jednak wziąć po uwagę, że synergizm jest zjawiskiem fizyko-chemicznym zachodzącym w komórkach, a nie prostym równaniem algebraicznym i/lub statystyką biorącą pod uwagę pojedyncze czynniki czy *p value*. Dlatego w przypadku badania interakcji leków znacznie powszechniej stosuje się analizy oparte o ocenę poziomu cytotoxyczności związków podawanych pojedynczo i w kombinacji z uwzględnieniem stosowanych dawek takie jak metoda izobologramów czy wyznaczania współczynnika CI (ang. *Combination Index*) przy użyciu równania efektu mediany według Chou i Talalay’a. Metody te umożliwiają określenie rodzaju interakcji według następujących kategorii: synergizm, addycja, antagonizm.

Podrozdział „Wyniki” zawiera krótkie omówienie uzyskanych danych. Ponieważ nie zawiera żadnych ilustracji ułatwiających odbiór czy weryfikację ich interpretacji warto zapoznać się z oryginalnymi publikacjami będącymi podstawą dysertacji. Wyniki są interesujące i warte upowszechnienia. Noszą znamiona nowości i stanowią istotny wkład w rozwój danej dziedziny badań. Należy jednak zauważyć, że samo zastosowanie inhibitorów PARP1 w liniach o obniżonej ekspresji *LIG4* okazało się niewystarczające, przynajmniej przy zastosowanych stężeniach (5 μM i 50 nM odpowiednio dla olaparybu i talazoparybu), do osiągnięcia znaczącego obniżenia przeżywalności komórek nowotworowych. Dlatego zastosowano wzmocnienie presji na wydajność komórkowych mechanizmów naprawy uszkodzeń DNA poprzez dodatkowe zastosowanie chemioterapeutyków z grupy czynników alkilujących, które m.in. indukują powstawanie uszkodzeń w DNA. Użycie kombinacji inhibitorów PARP1 i 2 mM dakarbazyny w przypadku komórek czerniaka i 6.25 μM temozolomidu w przypadku komórek glejaka dało znacznie silniejszy efekt niż pojedyncze zastosowanie tych związków i co równie istotne efekt ten był specyficzny wobec komórek nowotworowych. Szkoda, że nie zbadano dokładniej zachodzącej interakcji pomiędzy tymi związkami przy użyciu wspomnianych wcześniej metod, gdyż kategoryzacja zaobserwowanych interakcji znacznie podniosła by wartość poznawczą tych publikacji. Wykazano natomiast, że nadwrażliwość komórek na inhibitory PARP1 jest zależna od obniżonego poziomu białka *LIG4*. Pokazano bowiem na komórkach czerniaka, że nadekspresja z plazmidu fuzyjnego genu *GFP-LIG4*, w przeciwieństwie do samego *GFP*, sprzyja wzrostowi komórek w obecności olaparybu, natomiast na komórkach glejaka zademonstrowano, że konstrukt *GFP-LIG4* zwiększa żywotność komórek poddanych działaniu kombinacji inhibitora PARP1 i czynnika alkilującego. Ponadto dodatkowe doświadczenie porównujące wrażliwość na olaparyb komórek wywodzących się z linii NALM6 ludzkich białaczkowych komórek prekursorowych limfocytów B będących modelem ostrej białaczki limfoblastycznej (ang. *acute lymphoblastic leukemia*, ALL) zademonstrowało, że komórki pozbawione *LIG4* (*LIG4*^{-/-}) w przeciwieństwie do posiadających oba allele *LIG4* typu dzikiego (*LIG4*^{+/+}) wykazują silne zahamowanie wzrostu już w obecności olaparybu o stężeniu 150 nM. Fakt, że komórki z nokautem *LIG4* wykazują o jeden rząd wielkości wyższą wrażliwość na olaparyb od komórek czerniaka z obniżoną ekspresją *LIG4* pozwala sądzić, że w przypadku nowotworów z unieczynnionym genem *LIG4*

już nawet pojedyncza (bez czynników alkilujących) terapia przy użyciu inhibitorów PARP1 może okazać się skuteczna, jak zakładano w roboczej hipotezie będącej podstawą tej dysertacji.

Mam też dodatkowe uwagi i sugestie dotyczące wyników przedstawionych w dołączonych publikacjach. Przede wszystkim chciałabym, aby Doktorantka ustosunkowała się do kwestii, która nigdzie nie jest wprost poruszona, a dotyczy użytych do doświadczeń pierwotnych linii nowotworowych. Z analizy danych z bazy TCGA, na którą powołuje się sama Doktorantka, wynika, że np. w przypadku czerniaka izolaty o niefunkcyjnym genie *LIG4* bądź wykazujące jego obniżoną ekspresję stanowią tylko ~2.4 %, natomiast wśród użytych do doświadczeń 100%. Czy mamy zatem sądzić, że osoby wyprowadzające linie miały wyjątkowe szczęście lub może tego typu mutacje są szczególnie często występujące w polskiej populacji? A może wybrane jako kontrole linie komórek prawidłowych charakteryzują się szczególnie wysokim poziomem ekspresji *LIG4*? Czy też, co najbardziej prawdopodobne, uzyskano znacznie więcej linii nowotworowych i dokonano ich wstępnej selekcji właśnie pod kątem ekspresji *LIG4*? Informacja o liczbie wyprowadzonych linii komórkowych też jest enigmatyczna; np. w pracy Czyż *et al.* (2016) wymienionych jako wyizolowane jest 6 linii, ale wstępna charakterystyka dotyczy już tylko pięciu, a główne doświadczenia są wykonane tylko na dwóch liniach, choć trzeba przyznać, że trafnie wybranych, ponieważ poza oczekiwanym niższym poziomem białka *LIG4* linie wyprowadzone są ze zmian o innej morfologii, tj. ze zmiany powierzchniowej (DMBC11) i guzkowatej (DMBC12). W przypadku glejaka szkoda, że zrezygnowano z linii H3, która charakteryzowała się dodatkowo obniżonym poziomem ekspresji genu *BRCA2* i mogłaby stanowić dodatkową kontrolę, gdyż potencjalnie powinna silniej odpowiadać na inhibitor PARP1. W pracy dotyczącej linii czerniaka w analizie *in silico* (Fig. 1) zabrakło mi zwłaszcza genu *PARP1*, o którym informacje powinny cieszyć się szczególnym zainteresowaniem autorów. Natomiast w pracy na liniach glejaka w analizie poziomu wybranych mRNA (Fig. 1A) zaskakujący jest brak genu *XRCC4*, którego produkt białkowy nie tylko współdziała z *LIG4*, ale wręcz bezpośrednio z nim oddziałuje i go stabilizuje. Zatem informacja o ekspresji *XRCC4* mogłaby pomóc w wyjaśnieniu przyczyn obserwowanego niższego poziomu *LIG4*, czy informować o potencjalnym dodatkowym obniżeniu wydajności szlaku cNHEJ i tym samym większej wrażliwości danych komórek na inhibitor PARP1. Wracając do pracy na czerniaku, w doświadczeniach przedstawionych na Fig. 3B-C zabrakło mi wyników dla komórek prawidłowych, a kontrolę stanowią jedynie nietraktowane linie nowotworowe. Kontrole w postaci linii prawidłowych są bardzo cenne, gdyż pozwalają zaobserwować różnice pomiędzy komórkami prawidłowymi a nowotworowymi i powinny być stosowane wszędzie gdzie się da, czyli w tym przypadku we wszystkich doświadczeniach fizjologicznych z wyjątkiem testu klonogeniczności. Chciałabym również poznać zdanie Doktorantki dlaczego w analizie przebiegu cyklu komórkowego (Fig. 3C) postuluje brak znaczących zmian z wyjątkiem drobnych różnic polegających na wzroście populacji komórek w fazie G2/M podczas inkubacji z kombinacją związków, jeśli np. w przypadku linii DMBC11 po drugim podaniu związków zaobserwowano co najmniej 4-krotny wzrost populacji komórek w fazie G2/M i oznaczono go jako istotny statystycznie względem kontroli (komórek nietraktowanych).

Podrozdział „Podsumowanie i wnioski” zgodnie z oczekiwaniami zawiera krótkie podsumowanie wyników z elementami dyskusji. Doktorantka słusznie zauważa potrzebę wyjaśnienia mechanizmu stojącego za obserwowanym obniżonym poziomem ekspresji *LIG4* w wkorzystanych liniach nowotworowych i na podstawie danych literaturowych proponuje zaburzenia w komórkowych szlakach przekazywania sygnału takich jak JAK2-STAT5 lub PI3K-AKT jako odpowiedzialne za to zjawisko.

W podrozdziale „Wnioski” Doktorantka wypunktowuje główne wnioski wyciągnięte na podstawie wyników przedstawionych w dysertacji, a podrozdział „Literatura” zawiera spis cytowanego w „Streszczeniu” piśmiennictwa obejmującego prace z ostatnich 16 lat.

W obecnych czasach zdecydowana większość prac naukowych jest wynikiem zbiorowego wysiłku, często badaczy z różnych ośrodków naukowych. Niemniej dysertacja powinna umożliwić ocenę wkładu własnego doktoranta/doktorantki. W przypadku tej pracy doktorskiej taka ocena na podstawie samego „Streszczenia” jest bardzo utrudniona, ponieważ Doktorantka przedstawia wyniki całego zespołu i nie podkreśla własnego udziału w ich uzyskaniu. Recenzent musi zatem opierać się na zamieszczonych w publikacjach deklaracjach autorów oraz na oświadczeniach współautorów dołączonych do dysertacji. Do innych ogólnych uwag dotyczących tego rozdziału zaliczyć można występujący w większości przypadków brak rozróżnienia oznaczenia genu od jego produktu białkowego, stąd odbiorca musi z kontekstu odczytywać, czy w danej sytuacji autor ma na myśli gen, czy kodowane przez niego białko. W tekście pojawiają się również pewne inne niekonsekwencje, np. przy opisie izolacji komórek glejaka jest informacja o uzyskaniu zgody odpowiedniej komisji bioetycznej, natomiast w przypadku izolacji komórek czerniaka już nie!? Zakładam, że w obu przypadkach taka zgoda została udzielona. Stosowną informację powinno się więc umieścić w obu przypadkach lub w obu ją pominąć, zwłaszcza, że choć formalnie istotnie nie wpływa ona na uzyskane wyniki. Doktorantka nie ustrzegła się też stosowania pewnych skrótów myślowych i dosłownych tłumaczeń z języka angielskiego, przez co część zastosowanych określeń jest nieprecyzyjna, a czasem odbiorca może wręcz być wprowadzony w błąd; np. termin *double-strand breaks* (DSB) jest przedstawiany jako „pęknięcia dwuniciowych DNA” (np. str. 17) zamiast dwuniciowe pęknięcia w DNA. Analogicznie możemy znaleźć termin „pęknięcia jednoniciowych DNA” (str. 17) podczas gdy chodzi o utratę ciągłości tylko jednej z dwóch nici DNA, czyli o jednoniciowe pęknięcie w DNA (ang. *single-strand break*). Sformułowanie że „NHEJ jest głównym szlakiem naprawy w komórkach eukariotycznych” (str. 18) jest nieprecyzyjne, gdyż jest prawdziwe dla większości komórek ssaczych, ale np. już nie dla również jądrowych komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, w których to rekombinacja homologiczna jest podstawowym szlakiem naprawy DSB i dzięki temu względnie łatwo można wykonywać manipulacje genetyczne na ich genomie, a drożdże stały się organizmem modelowym. Zdanie „Glejak wielopostaciowy (...) wykazuje bardzo niski współczynnik przeżywalności...” (str. 18) może również wprowadzać w błąd, chodzi bowiem o przeżywalność pacjentów z nowotworem, a nie samego nowotworu. Termin ekspresja jest używany niewłaściwie np. w sformułowaniach „poziom ekspresji genów i białek” (str. 21), czy „spadek ekspresji badanych mRNA” (str. 22), ponieważ ekspresji/wyrażaniu ulegają tylko geny, a białka są produkowane na matrycy mRNA, co (zarówno transkrypcja, jak i translacja) jest właśnie przejawem ekspresji genów. Zdanie „Akumulacja DSB w komórkach czerniaka była jeszcze bardziej znacząca w wyniku testu kometowego...” (str. 24) jest również skrótem myślowym, bowiem zastosowanie żadnego testu nie wpływa na akumulację DSB w komórkach, a jedynie, w zależności od czułości i specyficzności użytego testu, na wartość liczbową otrzymanego wyniku. Kolejnym niepoprawnym określeniem jest „mutant białka” (str. 26), ponieważ mutacji ulega DNA, a mutantem jest organizm niosący w genomie mutację. Z braku lepszego określenia stosuje się czasem sformułowanie „zmutowane białko”, ale na pewno nie „mutant białka”. Podobnych przykładów nieścisłości, nieprecyzyjności, czy po prostu błędów edytorskich uważny czytelnik może znaleźć więcej, ale recenzja nie polega na ich kompletnym wypunktowaniu. Chodzi bardziej o to by zwrócić uwagę na dbanie o rozwój polskiego słownictwa naukowego oraz na fakt, że w pracach

naukowych liczą się nie tylko wspaniałe wyniki, ale także ich odbiór. Warto zatem po euforii tworzenia poświęcić nieco czasu na żmudną, ale niezbędną korektę opisu własnych dokonań.

Pragnę również podkreślić, że moje uwagi nie umniejszają wartości poznawczej ocenianej pracy, ani osiągnięć Autorki. Za najistotniejszy wynik uważam wykazanie po raz pierwszy, że już samo obniżenie poziomu białka LIG4 w komórkach linii pierwotnych czerniaka i glejaka zwiększa wrażliwość tych komórek na inhibitory PARP1 takie jak odpowiednio olaparyb i talazoparyb. Warto zwrócić uwagę na fakt, że w obu tych układach nie były w pełni spełnione warunki do osiągnięcia syntetycznej letalności, bowiem aktywne białko LIG4, choć na niższym poziomie, było jednak nadal obecne w komórce. Również nie można zakładać 100%-owej skuteczności hamowania aktywności PARP1 przez podane inhibitory, o czym może świadczyć fakt uzyskania silniejszej odpowiedzi na linii H7, czyli komórkach o endogennie niższym poziomie PARP1. Pomimo tego nawet wstępne testy na ksenografach u myszy również pozwalają mieć nadzieję, że dodatkowe zastosowanie czynników alkilujących używanych już w chemioterapii, po optymalizacji protokołu podania, może być rozwinięte w skuteczną terapię skojarzoną. Uzyskane niejako „przy okazji” wyniki na linii białaczkowej NALM6 *LIG4*^{-/-} wskazują, że zastosowanie terapii opartej na wywołaniu syntetycznej letalności poprzez farmakologiczne upośledzenie szlaku alt-NHEJ przez podanie inhibitora PARP1 w komórkach z nieaktywnym szlakiem cNHEJ może być równie skuteczne jak w komórkach z upośledzoną rekombinacją homologiczną. Daje to podstawy do ewentualnego przyszłego rozszerzenia stosowania inhibitorów PARP1 z rekomendowanych obecnie nowotworów piersi, jajnika czy prostaty z utratą funkcji *BRCA1* i/lub *BRCA2* także na inne nowotwory z nieaktywnym genem *LIG4*. Na bardziej ogólnym poziomie, uzyskane wyniki wskazują na potrzebę i celowość rozwijania terapii spersonalizowanych w leczeniu nowotworów. Z tego też względu wyniki uzyskane przez Doktorantkę w sposób istotny poszerzają naszą wiedzę oraz uzasadniają podjęcie tematu pracy. Pragnę także zauważyć, że Doktorantka wykazała się znajomością warsztatu badawczego oraz umiejętnością weryfikacji i analizy otrzymanych wyników, a jej imponujący dorobek publikacyjny świadczy o dojrzałości naukowej. Uważam również, że przedstawiona do recenzji praca doktorska wykonana pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Tomasza Śliwińskiego spełnia wymagania określone w aktualnie obowiązującej ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym i wnoszę do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie Pani mgr Moniki Toma do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem – *dr hab. n. farm. Sylwia Flis, prof. NIL*

KIEROWNIK
ZAKŁADU FARMAKOLOGII
SFlis
dr hab. n. farm. Sylwia Flis, prof. NIL