

Kielce, 12.03.2020

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

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Monika Toma

*Syntetyczna letalność w komórkach nowotworowych indukowana
inhibitorami białek naprawy pęknięć DNA*

Terapie celowane oparte o syntetyczną letalność mają obecnie przełożenie praktyczne w onkologii, a w ich rozwoju upatruje się poprawę skuteczność w leczeniu chorób nowotworowych. Rozprawa doktorska Pani mgr Moniki Toma stanowi istotny wkład w ten rozwój zarówno w wymiarze metodycznym, jak również koncepcyjnym w poszukiwaniu genów będących celem nowoczesnych terapii u podstaw których leży rzetelna wiedza z zakresu genetyki molekularnej nowotworów. Praca doktorska stanowiąca podstawę do nadania stopnia doktora została wykonana w Katedrze Genetyki Molekularnej UŁ pod kierunkiem prof. dr hab. Tomasza Śliwińskiego w ramach środków finansowych Narodowego Centrum Nauki OPUS “Białka naprawy pęknięć dwuniciowych DNA jako cele dla spersonalizowanej terapii przeciwnowotworowej opartej na syntetycznej letalności”, w którym pełnił funkcję kierownika. Ponadto badania prowadzone przez Panią mgr Monikę Toma otrzymały finansowanie w ramach grantów: NCN ETIUDA, kierowanym przez Doktorantkę pt. “Syntetyczna letalność w komórkach nowotworowych indukowana inhibitorami białek naprawy pęknięć DNA” oraz Kosiuszko Foundation w kategorii “2017-18 Exchange Grants” w ramach których odbyła staż w Temple University, Philadelphia PA, USA oraz University of Belgrade, Belgrade, Serbia. Możliwość realizacji rozprawy w doświadczonym międzynarodowym zespole jest wartością dodaną badań, której efektem jest spójna i przemyślana koncepcja pracy oparta na nowoczesnych technikach genetyki molekularnej, immunochemii, metodach hodowli komórkowej oraz geno- i cytotoxkologii.

Celem badań było badanie odpowiedzi linii pierwotnych glejaka i czerniaka wykazujących obniżoną ekspresję białek biorących udział w naprawie podwójnych pęknięć na zastosowanie inhibitorów alternatywnych szlaków naprawy. Uzyskane wyniki opublikowano w pięciu pracach, w tym dwóch doświadczalnych z wkładem Pani mgr Moniki Toma na poziomie 35 % oraz 66 %:

- Czyż M*, Toma M*, Gajos-Michniewicz A, Majchrzak K, Hoser G, Szemraj J, NieborowskaSkorska M, Cheng P, Gritsyuk D, Mitchell Levesque, Dummer R, Śliwiński T, Skorski T. PARP1 inhibitor olaparib (Lynparza) exerts synthetic lethal effect against ligase 4 deficient melanomas. *Oncotarget* 2016; 7(46): 75551-75560.
- Toma M, Witusik-Perkowska M, Szwed M, Stawski R, Szemraj J, Drzewiecka M, Nieborowska-Skorska M, Radek M, Kolasa M, Matlawska-Wasowska K, Śliwiński T, Skorski T. Eradication of LIG4-deficient glioblastoma cells by the combination of PARP inhibitor and alkylating agent. *Oncotarget* 2018; 9(96): 36867-36877.

oraz

trzech pracach o charakterze przeglądowym, stanowiące aktualne i wyczerpujące kompendium wiedzy z zakresu syntetycznej letalności jako potencjalnej terapii przeciwnowotworowej, w których wkład procentowy Doktorantki wynosi odpowiednio 80%, 80%, i 77%:

- Toma M, Skorski T, Śliwiński T. Syntetyczna letalność jako funkcjonalne narzędzie w badaniach podstawowych oraz w terapii przeciwnowotworowej. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. 2014; 68: 1091-1103.
- Toma M, Skorski T, Śliwiński T. DNA Double Strand Break Repair - Related Synthetic Lethality. *Current Medicinal Chemistry*. 2019; 26(8): 1446-1482(37).
- Toma M, Sullivan-Reed K, Skorski T, Śliwiński T. RAD52 as a Potential Target for Synthetic Lethality-Based Anticancer Therapies. *Cancers* 2019; 11, 1561.

W sumie, na spójny tematycznie cykl składa się 5 prac, których sumarycznym IF wynosi 15.797 i liczbę punktów MNiSW równą 265. Ponadto, Pani mgr Monika Toma jest współautorką 24 prac o sumarycznym IF wynoszącym 97.734 i 1085 pkt. MNiSW, pełniła funkcję kierownika projektu ETIUDA Narodowego Centrum Nauki, wynik badań prezentowała na 17 konferencjach w zdecydowanej większości zagranicznych. Publikacje naukowe, których współautorką jest Pani mgr Monika Toma były cytowane 177 razy (bez autocytowań), a jej *h*-indeks wynosi 10 według bazy SCOPUS. Podsumowując, dorobek naukowy Doktorantki jest imponujący i świadczy o dojrzałości naukowej w zakresie realizacji i publikacji wyników badań, pozyskiwaniu środków na działalność badawczą oraz umiejętności pracy w zespole.

Na wysoką wartość badań naukowych zrealizowanych przez Doktorantkę w ramach rozprawy doktorskiej składa się aktualność problematyki o znaczeniu praktycznym której oryginalne rozwiązanie wymagało opanowania złożonej metodyki. Realizacja badań wymagała optymalizacji empirycznej trudnych technik, jak wyprowadzanie linii pierwotnych czerniaka i glejaka. Charakterystykę otrzymanych linii komórkowych potwierdzono poprzez zastosowanie markerów powierzchniowych i genetycznych, jak również analizę utraty heterozygotyczności. W liniach tych Doktorantka określiła profil ekspresji genów zaangażowanych w naprawę pęknięć dwuniciowych (DSB) z wykorzystaniem metody TaqMan PCR oraz Western blot na poziomie białka. W wyniku powyższej analizy Doktorantka wykazała obniżoną ekspresją LIG4, co stanowiło podstawę do opracowania kombinacji leków mających na celu zablokowanie szlaku alternatywnego altNHEJ, opierając się na zjawisku syntetycznej letalności. Odpowiedź komórkowa była badana po zastosowaniu inhibitorów PARP1 - olaparybu w liniach czerniaka i talazoparybu w liniach glejaka, podawanych samodzielnie lub w kombinacji ze związkiem alkilującym dakarbazyna w przypadku czerniaka lub temozolomid w glejaku. W kolejnym etapie badań Pani mgr Monika Toma analizowała efekt biologiczny zastosowanej kombinacji leków na otrzymane linie pierwotne tj. poziom komórek apoptotycznych i nekrotycznych z zastosowaniem cytometrii przepływowej z barwieniem jodek propidyny/aneksyna V, zmiany morfologiczne komórek z zastosowaniem mikroskopii fluorescencyjnej z barwieniem kalceiną, zdolność proliferacji z wykorzystaniem testu klonogenności oraz poziom DSB z wykorzystaniem testu ELISA wykrywającego ufosforylowany histon γ H2A.X oraz wersji neutralnej testu kometowego.

Ponadto, Doktorantka wykonała dodatkowe analizy, które potwierdziły zasadność wyboru oraz mechanizm działania opisanej powyżej kombinacji leków celowanych w naprawę DSB w warunkach obniżonego poziomu LIG4. W tym celu komórki z obniżoną ekspresją LIG4 zostały poddane transfekcji plazmidem pCMV6-AC-GFP-LIG4, co skutkowało podwyższeniem poziomu tego białka, zastosowano kolejny model linii NALM6 rodzicielskiej i NALM6 LIG4^{-/-}, a PARP-1 wyciszano z zastosowaniem siRNA. W układach tych zaobserwowano utratę wrażliwości na inhibitory.

Uzyskane wyniki pozwoliły na wytworzenie nowej wiedzy z zakresu genetyki nowotworów, która leży u podstaw potencjalnego mechanizmu terapeutycznego zoptymalizowanego również w ramach rozprawy. Kluczowa jest tutaj obserwacja iż obniżony poziom ekspresji LIG4 w komórkach linii pierwotnych czerniaka i glejaka jest skorelowany z wrażliwością na zastosowanie inhibitorów PARP1 w kombinacji ze związkiem alkilującym, co wzmacnia efekt zahamowania alternatywnego szlaku naprawy DSB i skutkuje obniżeniem przeżywalności komórek nowotworowych. W tym

miejscu mam pytanie dotyczące kolejnej fazy badań zainicjowanej już analizami *in vivo* na myszach NSG i ksenograftach linii pierwotnej czerniaka DMBC11, zwłaszcza w wymiarze klinicznym.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Moniki Toma pt. „Syntetyczna letalność w komórkach nowotworowych indukowana inhibitorami białek naprawy pęknięć DNA” spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz 595 z późn.zm). Biorąc pod uwagę wysoką jakość badań naukowych, jak również bogatą w pełni opanowaną przez Doktorantkę metodykę badań wnoszę do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Moniki Toma do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, pragnę zgłosić rozprawę do wyróżnienia mając na uwadze rzetelność przeprowadzonych badań o potencjale klinicznym.


dr hab. Michał Arabski
Uniwersytet Jana Kochanowskiego
w Kielcach