UNIWERSYTET ŚLĄSKI
W KATOWICACH

Prof. Robert Musioł
Instytut Chemii
Uniwersytet Śląski w Katowicach

Katowice 23.10.2026

Recenzja rozprawy doktorskiej pt. „Mechanistic studies on selected novel anticancer compounds modulating the function of telomeric proteins", napisanej przez Pana mgr Anoop Kallingala, pod kierunkiem prof. dr. hab. inż. Macieja Bagińskiego oraz dr Natalii Maciejewskiej jako promotora pomocniczego.

Rozprawa koncentruje się na mechanizmach działania nowych związków o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej, które wpływają na funkcjonowanie telomerów. Autor bada w szczególności związki zaprojektowane w celu modulowania interakcji pomiędzy białkami TRF1 i TIN2, będącymi ważnymi składnikami kompleksu białek ochronnych shelterin. Kompleks ten odgrywa kluczową rolę w ochronie końców chromosomów i utrzymaniu stabilności telomerów. Ponieważ komórki nowotworowe są zależne od mechanizmów utrzymujących telomery, które umożliwiają im nieograniczone namnażanie, celowanie w białka telomerowe uznaje się za obiecującą strategię w terapii przeciwnowotworowej. Tematyka rozprawy jest zatem istotna naukowo i aktualna. Dotyczy ważnego zagadnienia w badaniach nad nowotworami oraz rozwoju nowych leków przeciwnowotworowych.

Rozprawa ma klasyczną strukturę i liczy 180 stron, obejmujących części wstępne, tekst główny, piśmiennictwo oraz załączniki. Tekst główny podzielono na sześć ponumerowanych rozdziałów. Wprowadzenie przedstawia ogólne tło badań. Autor krótko omawia znaczenie nowotworów jako istotnego problemu zdrowotnego, problem oporności na leczenie, nieśmiertelność komórek nowotworowych oraz rolę telomerów w progresji nowotworu. Rozdział wprowadza również kompleks shelterin i wyjaśnia, dlaczego interakcja między białkami TRF1 a TIN2 może być rozpatrywana jako potencjalny cel dla związków przeciwnowotworowych. Drugi rozdział, Hipoteza badawcza i cele pracy, przedstawia główne założenia, cel pracy oraz pytania i zadania badawcze. Wskazano w nim również ogólną strategię badawczą oraz przewidywane znaczenie i uszczegółowiono nowatorski charakter pracy. Przegląd literatury jest obszerny, liczy ponad 20 stron i przedstawia szczegółowy przegląd zagadnień związanych z biologią telomerów oraz kompleksem shelterin. Szczególną uwagę poświęcono strukturze i funkcjom białek TRF1 i TIN2, ich

Uniwersytet Śląski w Katowicach
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych
Instytut Chemii
ul. Szkolna 9, 40-006 Katowice
tel. 32 359 15 45, e-mail: ich.wnst@us.edu.pl

www.us.edu.pl/instytut/ich

HR EXCELLENCE IN RESEARCH

interakcjom z innymi białkami kompleksu shelterin oraz ich roli w ochronie i replikacji telomerów. Autor omawia także wcześniejsze próby wykorzystania białek kompleksu shelterin jako celów terapii przeciwnowotworowej. Rozdział ten stanowi naukowe podstawy części eksperymentalnej rozprawy i uzupełnia krótsze wprowadzenie.

Kolejny rozdział zawiera zwięzły opis materiałów i metod. Autor przedstawia zastosowane metody eksperymentalne i obliczeniowe, obejmujące dobór związków, dokowanie molekularne, testy żywotności komórek, hybrydyzację fluorescencyjną telomerów (Telo-FISH), analizę Western blot oraz sekwencjonowanie RNA. Opisano również badania migracji komórek, tworzenia kolonii i sferoidów, angiogenezy oraz wzrostu guzów w modelu zarodka kurzego, a także metody analizy statystycznej. Metody zostały opisane z wystarczającą szczegółowością, aby umożliwić odtworzenie eksperymentów w innych laboratoriach.

Należy zaznaczyć, że związki badane w rozprawie zostały opracowane i zsyntetyzowane w ramach odrębnego projektu realizowanego w Laboratorium Chemii Organicznej dr. Sławomira Makowca na Politechnice Gdańskiej, przy udziale Anny Hromovej, Radosława Krzemienieckiego i pozostałych członków zespołu. Z tego względu szczegółowe opisy procedur syntezy nie zostały zamieszczone w rozprawie. Struktury związków przedstawiono w załączniku w formacie przypominającym dokumentację patentową. Takie podejście jest zrozumiałe, biorąc pod uwagę szeroki zakres badań przeprowadzonych w ramach rozprawy.

Zgodnie z oczekiwaniami rozdział 5, poświęcony wynikom, jest największą częścią rozprawy obejmując 19 podrozdziałów. Autor najpierw przedstawia dobór związków, ich aktywność cytotoksyczną i selektywność oraz badania ich wiązania z TRF1. Wyniki te uzupełniono modelowaniem molekularnym. W kolejnych częściach opisano wpływ związków na uszkodzenia DNA, replikację DNA, przebieg cyklu komórkowego, funkcjonowanie mitochondriów, apoptozę i starzenie komórkowe. Dalsze eksperymenty obejmują badania migracji komórek, tworzenia kolonii, wzrostu sferoidów, angiogenezy oraz rozwoju mikroguzów. Rozdział zawiera również analizy nieprawidłowości telomerowych, zmian ekspresji białek oraz odpowiedzi transkryptomicznej na badane związki. Lektura tej części rozprawy pozwala docenić imponujący zakres przeprowadzonych badań. Na szczególne uznanie zasługuje szeroki wachlarz metod i uzupełniających się strategii eksperymentalnych zastosowanych do realizacji celów pracy, co świadczy o znacznym nakładzie pracy włożonym w badania.

Dyskusja, przedstawiona w osobnym rozdziale, zawiera pogłębioną analizę zależności pomiędzy wiązaniem związków z TRF1, dysfunkcją telomerów, stresem replikacyjnym i obserwowanymi odpowiedziami komórkowymi. Wyniki omówiono w odniesieniu do opublikowanych badań, a także przedstawiono ograniczenia pracy i kierunki dalszych badań.

Uniwersytet Śląski w Katowicach
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych
Instytut Chemii
ul. Szkolna 9, 40-006 Katowice
tel. 32 359 15 45, e-mail: ich.wnst@us.edu.pl

www.us.edu.pl/instytut/ich

Całość zamykają wnioski wraz z bibliografią, która obejmuje 219 pozycji, dotyczących zarówno podstawowych zagadnień biologii telomerów, jak i nowszych publikacji związanych z tematyką rozprawy. Pod względem redakcyjnym rozprawa w zdecydowanej większości została przygotowana bardzo starannie.

Głównym celem rozprawy było zbadanie mechanizmów działania wybranych nowych związków o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej, zaprojektowanych w celu oddziaływania na interakcję pomiędzy białkami TRF1 i TIN2. Autor dążył do ustalenia, czy związki te wiążą się z TRF1, wpływają na stabilność telomerów i replikację DNA oraz wywołują odpowiedzi komórkowe mogące ograniczać wzrost i przeżycie komórek nowotworowych. Dodatkowym celem było wyłonienie najbardziej obiecujących związków do dalszego rozwoju. Aby osiągnąć te cele, autor zastosował szerokie podejście badawcze, łączące metody obliczeniowe, pomiary biofizyczne i techniki biologii komórki. Dobór metod był odpowiedni do postawionych celów badawczych. Metody wybrano w logiczny sposób, a wyniki poszczególnych eksperymentów stanowiły podstawę do zaplanowania kolejnych etapów badań.

Badania rozpoczęto od wyboru związków pochodnych związku macierzystego A822 z wykorzystaniem dokowania molekularnego i wirtualnego przesiewania. Związki, jak wspomniano wcześniej, otrzymano w ramach większego projektu w innym laboratorium a następnie poddano ocenie aktywności biologicznej. Pierwszy etap eksperymentalny obejmował badanie A822 i jedenastu jego pochodnych na panelu 19 linii komórek nowotworowych, a także ocenę cytotoksyczności wobec wybranych linii komórek normalnych.

Kolejny etap koncentrował się na oddziaływaniu wybranych związków z białek kompleksu shelterinTRF1. W celu zbadania ich bezpośredniego wiązania z białkiem zastosowano powierzchniowy rezonans plazmonowy (SPR), natomiast symulacje dynamiki molekularnej dostarczyły dodatkowych informacji na temat możliwych sposobów wiązania oraz stabilności przewidywanych kompleksów białko–ligand. Badania immunofluorescencyjne wykorzystano do oceny występowania uszkodzeń DNA, w szczególności zmian poziomu γH2AX oraz kolokalizacji sygnału γH2AX z TIN2. Analiza cyklu komórkowego i testy włókien DNA dostarczyły informacji o zaburzeniach przebiegu cyklu komórkowego i replikacji DNA. W połączeniu z pozostałymi testami umożliwiło to Panu Kallingalowi szeroką ocenę odpowiedzi komórkowej na działanie badanych związków. Dodatkowe badania na trójwymiarowych sferoidach komórkowych oraz z wykorzystaniem błony zarodka kurzego poszerzyły ocenę biologiczną poza standardowe hodowle komórkowe, stanowiąc dobrą podstawę do dalszych badań *in vivo*.

Szczególną uwagę należy zwrócić na eksperymenty bezpośrednio związane z biologią telomerów. Dzięki zastosowaniu Telo-FISH autor zbadał nieprawidłowości chromosomowe związane z dysfunkcją telomerów, w tym utratę sygnałów telomerowych, występowanie podwójnych sygnałów telomerowych oraz

fuzje chromosomów. Wyniki te uzupełniono pomiarami intensywności fluorescencji telomerów. Ta część badań miała szczególne znaczenie, ponieważ łączyła proponowany cel molekularny z obserwowanymi zmianami w obrębie końców chromosomów. Moim zdaniem jedną z głównych zalet rozprawy jest kompleksowa i dobrze uporządkowana strategia badawcza. Autor nie ograniczył się do jednej metody eksperymentalnej, lecz zastosował kilka uzupełniających się podejść, aby możliwie szeroko zbadać aktywność związków. Kolejną zaletą jest logiczne przejście od wstępnego przesiewania stosunkowo dużej grupy związków do szczegółowych badań mechanistycznych wybranych kandydatów.

Połączenie tych podejść nadaje rozprawie znaczną wartość eksperymentalną. Wyniki przedstawiają szeroki i spójny obraz aktywności biologicznej badanych związków oraz stanowią użyteczną podstawę do dalszych badań nad mechanizmami ich działania i potencjalnym zastosowaniem przeciwnowotworowym. Takie podejście pozwoliło na sformułowanie naukowo uzasadnionych wniosków, w tym na identyfikację kilku pochodnych A822 o obiecującej aktywności przeciwnowotworowej. Związki te wywoływały stres replikacyjny, uszkodzenia DNA i nieprawidłowości telomerowe, a także ograniczały proliferację komórek nowotworowych. Wyniki sugerują, że efekty te mogą być związane z modulacją funkcji TRF1.

Obowiązkiem recenzenta jest również, a może przede wszystkim wskazać słabsze strony, błędy lub ograniczenia rozprawy. Moja główna uwaga dotyczy interpretacji proponowanego mechanizmu działania badanych związków. Jednym z głównych założeń projektu jest możliwość zakłócania przez te związki interakcji pomiędzy TRF1 i TIN2. Autor przedstawia wyniki eksperymentalne wskazujące, że wybrane związki wiążą się z TRF1, a wyniki modelowania molekularnego sugerują możliwe miejsca ich wiązania. Badania biologiczne wykazują ponadto stres replikacyjny, uszkodzenia DNA i nieprawidłowości telomerowe, co sugeruje, że związki mogą wpływać na funkcjonowanie kompleksu shelterin. Co do zasady wyniki te tworzą spójną całość i dobrze potwierdzają hipotezy autora. Jednak nie dowodzą bezpośrednio, że związki hamują interakcję pomiędzy TRF1 i TIN2. W szczególności eksperymenty SPR wykazują wiązanie z TRF1, a nie konkurencję z TIN2. Obserwowane efekty komórkowe mogą również wynikać z innych następstw wiązania z TRF1 lub z bardziej ogólnego wpływu na replikację i integralność DNA, na przykład wskutek bezpośredniego oddziaływania związków z DNA lub zakłócania struktury G-kwadrupleksów. W związku z tym chciałbym zapytać autora, czy alternatywne mechanizmy mogłyby prowadzić do podobnych efektów oraz jakie testy można byłoby zastosować w komórkach, aby zweryfikować tą hipotezę.

Moja druga uwaga dotyczy swoistości obserwowanych efektów komórkowych. Autor opisuje wzrost poziomu γH2AX, czyli zmodyfikowanego histonu będącego markerem odpowiedzi na uszkodzenie DNA, zaburzenia replikacji DNA oraz inne reakcje związane ze stresem komórkowym, w kontekście zmian telomerowych. Z pewnością jednak nie wszystkie przedstawione obserwacje można powiązać wyłącznie

Uniwersytet Śląski w Katowicach
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych
Instytut Chemii
ul. Szkolna 9, 40-006 Katowice
tel. 32 359 15 45, e-mail: ich.wnst@us.edu.pl

www.us.edu.pl/instytut/ich

i bezpośrednio z funkcją telomerów. Należy jednak zaznaczyć, że autor w znacznym stopniu odnosi się do tych zagadnień w punkcie 6.8, zatytułowanym „Zakres i ograniczenia dalszych badań". Dyskusja ta świadczy o dobrym zrozumieniu ograniczeń zastosowanego podejścia eksperymentalnego oraz o wyważonej interpretacji wyników. Autor wykazuje tym samym właściwą świadomość różnicy pomiędzy ustaleniami bezpośrednio potwierdzonymi przez dane a proponowanymi mechanizmami, które wymagają dalszej walidacji eksperymentalnej.

Na koniec należy wspomnieć, że rozprawa zawiera jedynie kilka drobnych błędów redakcyjnych i bibliograficznych. Dotyczą one między innymi niekonsekwentnego stosowania terminologii, nieprecyzyjnych opisów mierzonych parametrów oraz formatowania piśmiennictwa. Przykładowo, zmiany intensywności fluorescencji sygnałów telomerowych są traktowane jako równoważne zmianom długości telomerów. Tymczasem zmiana długości telomerów jest tylko jedną z możliwych przyczyn zmian intensywności fluorescencji w tym eksperymencie. Niektóre pozycje bibliograficzne również wymagają korekty, w szczególności pozycje 66 i 72 dotyczące baz danych struktur białkowych PDB, które nie są zgodne z zasadami przyjętymi przez tę bazę. Są to drobne kwestie, które można łatwo poprawić i które nie wpływają na wartość naukową rozprawy, którą oceniam wysoko. Przedstawione uwagi nie podważają wyników eksperymentalnych ani ogólnej wartości przeprowadzonych badań. Moim zdaniem rozprawa zawiera znaczną ilość oryginalnej pracy eksperymentalnej, a jej wkład naukowy jest znaczny.

Podsumowując, uważam, że rozprawa dowodzi, iż Pan Anoop Kallingal jest dobrze przygotowanym młodym naukowcem, posiadającym szeroką wiedzę naukową i bogaty zestaw umiejętności eksperymentalnych. Wykazał zdolność do planowania i prowadzenia złożonych badań, stosowania różnych metod eksperymentalnych, analizowania wyników oraz formułowania naukowo uzasadnionych wniosków. Zakres i jakość pracy świadczą również o jego zdolności do prowadzenia samodzielnych badań naukowych.

Moim zdaniem rozprawa stanowi nowy i oryginalny wkład naukowy w obszarze chemii medycznej, w szczególności opracowywania i oceny nowych związków o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej, a także biologii molekularnej i komórkowej, zwłaszcza badań nad funkcją telomerów, kompleksem shelterin oraz mechanizmami odpowiedzi komórek nowotworowych na leczenie.

Należy również podkreślić, że aktywność naukowa pana Kallingala wykracza daleko poza badania przedstawione w rozprawie. Jego dorobek obejmuje 16 publikacji naukowych, głównie w renomowanych czasopismach, zgłoszenie patentowe oraz aktywny udział w konferencjach naukowych. Dorobek ten świadczy o jego dużym zaangażowaniu w działalność naukową i zdolności do pracy w zespołach badawczych.

Uniwersytet Śląski w Katowicach
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych
Instytut Chemii
ul. Szkolna 9, 40-006 Katowice
tel. 32 359 15 45, e-mail: ich.wnst@us.edu.pl

www.us.edu.pl/instytut/ich

Biorąc pod uwagę wartość naukową rozprawy, oryginalność przedstawionych wyników, szeroki zakres przeprowadzonych badań eksperymentalnych oraz całokształt osiągnięć naukowych kandydata, **oceniam rozprawę pozytywnie**.

W związku z powyższym wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Gdańskiej o dopuszczenie pana Anoop Kallingala do dalszych etapów postępowania.

Jednocześnie mając na uwadze wysoką jakość naukową, innowacyjny charakter oraz duży potencjał aplikacyjny wyników przedstawionych w rozprawie, wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej przez Radę Dyscypliny Nauki Chemiczne. Szczególna wartość tej rozprawy polega na jej wkładzie w początkowy etap opracowywania nowych leków przeciwnowotworowych. Przeprowadzone badania umożliwiły identyfikację nowych struktur chemicznych o wysokiej aktywności przeciwnowotworowej a także wyłonienie związków wiodących opartych na nowym szkielecie. Co szczególnie istotne to, że praca nie ogranicza się do identyfikacji związków wykazujących aktywność biologiczną, lecz obejmuje również badanie leżących u jej podłoża procesów molekularnych i komórkowych, wyjaśniając mechanizm oraz prowadząc do wstępnych badań in vivo co znacząco podnosi potencjał aplikacyjny.

Uzyskane wyniki wspierają hipotezę, że związki te mogą wywierać swoje działanie poprzez zaburzanie procesów związanych z telomerami oraz funkcjonowania białek kompleksu shelterin. Wskazuje to na obiecujący, lecz niewystarczająco poznany kierunek rozwoju leków przeciwnowotworowych.

Znaczenie tych badań podkreśla również złożoność analizowanego celu biologicznego. Chociaż utrzymanie telomerów i białka kompleksu shelterin odgrywają istotną rolę w biologii komórek nowotworowych, ukierunkowanie terapii na te procesy pozostaje trudnym obszarem poszukiwania nowych leków i nie stanowi dotychczas ugruntowanej strategii terapeutycznej stosowanej w onkologii klinicznej. Badania pana Kallingala podejmują zatem wymagający problem naukowy w sposób całościowy obejmując projektowanie, identyfikację nowych potencjalnych leków kierowanych na zupełnie nowy cel. Opracowanie to stanowi wartościowy wkład w aktualny stan wiedzy i tworzy kierunki dalszego rozwoju dziedziny.

Chociaż konieczne są dalsze badania, aby potwierdzić proponowany mechanizm działania i określić potencjał terapeutyczny zidentyfikowanych związków, połączenie identyfikacji oryginalnych struktur chemicznych, analizy ich potencjalnych mechanizmów działania oraz znaczenia podjętego problemu naukowego stanowi, w mojej opinii, mocne uzasadnienie dla wyróżnienia rozprawy doktorskiej.

Robert Musioł

Uniwersytet Śląski w Katowicach
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych
Instytut Chemii
ul. Szkolna 9, 40-006 Katowice
tel. 32 359 15 45, e-mail: ich.wnst@us.edu.pl

www.us.edu.pl/instytut/ich

HR EXCELLENCE IN RESEARCH