

Warszawa, 13.05.2025 r.

Prof. dr hab. n. med. Elżbieta Sarnowska
Zakład Immunoterapii Eksperymentalnej
Narodowy Instytut Onkologii – Państwowy Instytut Badawczy
Ul. Roentgena 5
02-781 Warszawa

Recenzja rozprawy doktorskiej pt. „Przełamanie oporności wielolekowej nowotworów na poziomie genomu: opracowanie metody zapobiegającej nadekspresji transporterów ABC w komórkach nowotworowych opartej na inhibitorach enzymów remodelujących chromatynę”, mgr Magdaleny Strachowskiej.

Obecnie choroby nowotworowe są jedną z głównych przyczyn zgonów na świecie. Szacuje się, że w najbliższych latach mogą one stać się ich dominującą przyczyną, przewyższając inne schorzenia przewlekłe, takie jak choroby sercowo-naczyniowe. W związku z tym nowotwory stanowią poważny problem cywilizacyjny i wyzwanie dla współczesnej medycyny. Zrozumienie mechanizmów molekularnych i komórkowych leżących u podstaw transformacji nowotworowej, progresji choroby oraz interakcji komórek nowotworowych ze środowiskiem guza, w tym z układem odpornościowym, jest kluczowe dla opracowywania skutecznych metod zapobiegania, wczesnej diagnostyki i leczenia. Chociaż obecnie stosuje się wiele terapii przeciwnowotworowych, takich jak chemioterapia, radioterapia, immunoterapia, terapie celowane czy leczenie hormonalne, skuteczność wielu z nich jest ograniczona. Główną przyczyną niepowodzeń terapeutycznych jest rozwój oporności wielolekowej (MDR, multidrug resistance), czyli zdolności komórek nowotworowych do unikania działania różnych klas leków. Oporność ta może mieć charakter pierwotny (występujący od początku leczenia) lub nabyty (rozwijający się w trakcie terapii) i wynika z wielu mechanizmów, takich jak: nadekspresja

transporterów błonowych, zmiany w szlakach sygnałowych i regulacyjnych, mutacje w konkretnych genach, aktywacja mechanizmów naprawy DNA, czy zmiany w mikrośrodowisku guza. Jednym z najbardziej agresywnych nowotworów piersi, opornym na leczenie, w którym brak jest terapii celowanej a immunoterapia nie przynosi spektakularnych wyników jest potrójnie ujemny rak piersi. Ponadto wiele innych typów nowotworów m.in. w raku płuca, trzustki, etc. mechanizm oporności wielolekowej jest poważnym problemem terapeutycznym. Oporność wielolekowa jest głównie związana ze specyficzną ekspresją grupy białek pełniących funkcję przezbłonowych pomp molekularnych m. in transporterów ABC.

Celem przedstawionej rozprawy doktorskiej była analiza funkcji białka p300 w wytwarzaniu oporności wielolekowej na wybrane chemioterapeutyki poprzez indukcję transkrypcji genów z rodziny ABC. Ponadto, szczegółowe cele pracy obejmowały: identyfikację białek ABC, które ulegały nadekspresji w komórkach nowotworowych opornych na chemioterapeutyki, identyfikacja ich wewnętrznej lokalizacji w tych komórkach, wpływ inhibitorów bromodomeny CBP/p300 oraz inhibitorów PARP-1 na ekspresję białek ABC, zbadanie wpływu ADP-rybozylacji w zależnej od p300 nadekspresji białek ABC, identyfikacja czynnika transkrypcyjnego towarzyszącego PARP-1 w miejscach regulatorowych w wybranych genach transporterów ABC, które ulegają ekspresji w liniach opornych na chemioterapeutyki oraz identyfikacja modyfikacji potranslacyjnych białka PARP-1, które mogą mieć wpływ na jego funkcję.

Rozprawa została przygotowana w sposób przemyślany i spójny. Składa się ze streszczenia, w którym klarownie przedstawiono główny problem badawczy, części wprowadzającej, jasno zdefiniowanych celów pracy, przejrzystej prezentacji wyników badań oraz dobrze uargumentowanych wniosków końcowych. Osobne miejsce w pracy zajmuje wykaz publikacji

stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, kompletne wersje tych publikacji oraz stosowne oświadczenia współautorów, co świadczy o przejrzystości i zgodności pracy z zasadami etyki naukowej. Na szczególne uznanie zasługuje rozbudowana i klarownie napisana część wprowadzająca, która w sposób rzeczowy wprowadza czytelnika w aktualny stan wiedzy w dziedzinie regulacji ekspresji genów MDR oraz mechanizmów oporności nowotworów na leczenie. Cele badawcze zostały przedstawione w sposób precyzyjny i logiczny, a wyniki badań zostały opisane z należyłą starannością i opatrzone rzeczową interpretacją. Wnioski końcowe są poprawnie sformułowane, dobrze osadzone w kontekście uzyskanych danych eksperymentalnych i ukazują trafność przyjętych hipotez badawczych. Rozprawa zawiera również streszczenia w języku polskim i angielskim, co umożliwia szerszemu gronu odbiorców zapoznanie się z jej treścią. Całość pracy została przygotowana w sposób przejrzysty, logiczny i przystępny, co znacznie ułatwia ocenę osiągnięć badawczych Doktorantki. Warto także podkreślić, że Doktorantka wykazała się dużą samodzielnością, dojrzałością naukową oraz umiejętnością krytycznej analizy wyników. Jej osiągnięcia zostały przedstawione w sposób wyważony i merytoryczny, co świadczy o wysokim poziomie kompetencji naukowych. Praca spełnia wszelkie wymogi formalne i jest zgodna z Ustawą z dnia 20 lipca 2018 roku – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) oraz odpowiednimi aktami wykonawczymi wydanymi na jej podstawie, regulującymi tryb i warunki przeprowadzania postępowań w sprawie nadania stopnia doktora, doktora habilitowanego oraz tytułu profesora.

W pracy Doktorantka przeanalizowała ekspresję genów z rodziny ABC w różnych liniach komórkowych (raka piersi TNBC, raka wątroby i raka płuca) opornych na chemioterapeutyki używane w leczeniu nowotworów w tym, cisplatynę, doksorubicynę i paklitaksel. Wysoka ekspresja niektórych transporterów ABC jest związana z opornością wielolekową w komórkach nowot-

worowych. W swojej pracy Doktorantka zbadała czy I-CBP112, inhibitor bromodomeny CBP/p300, wpływa na wrażliwość linii komórkowych na zastosowane chemioterapeutyki. Zastosowanie I-CBP112 prowadziło do zmniejszenia ekspresji badanych transporterów ABC w komórkach raka piersi (MDA-MB-231), płuc (A549) i wątroby (HepG2) i zwiększenia akumulacji leków przeciwnowotworowych, takich jak doksorubicyna, daunorubicyna i metotreksat, wewnątrz komórek oraz znaczne uwrażliwienie komórek na szeroki zakres chemioterapeutyków.

Dlaczego Doktorantka wybrała te, a nie inne linie nowotworowe i jakie kryteria przyjęto przy wyborze linii komórkowych do badań?

W dalszej części Doktorantka wykazała, że promotory genów ABCC1 i ABCC10, których ekspresja została zahamowana przez I-CBP112 w komórkach MDA-MB-231, charakteryzowały się zwiększoną acetylacją nukleosomów oraz znacznym obniżeniem trimetylacji histonu H3K4me3, co jest związane z aktywacją transkrypcji. Inhibitor bromodomeny CBP/p300 indukował rekrutację demetylazy LSD1 do promotorów tych genów. Hamowanie LSD1 w obecności I-CBP112 zapobiegało represji ABCC1 i ABCC10 oraz, w znacznym stopniu, uwrażliwieniu komórek nowotworowych na leki. **Jakie mechanizmy molekularne odpowiadają za represję ekspresji genów ABCC1 i ABCC10 po zastosowaniu inhibitora bromodomeny CBP/p300 (I-CBP112) i jaki jest udział demetylazy LSD1 w tym procesie? Jakie inne funkcje, poza regulacją transkrypcji poprzez acetylacje reszt lizynowych na ogonach histonowych, pełni p300 w komórkach nowotworowych? Ciekawa również jestem, czy obserwowana zmiana w ekspresji transporterów ABC ma charakter odwracalny po usunięciu inhibitora? Bardzo często terapie skojarzone są zdecydowanie bardziej toksyczne dla pacjentów niż monoterapie, czy istnieje ryzyko, że połączenie inhibitorów CBP/p300 za chemioterapeutykami będzie bardziej toksyczne oraz czy długotrwałe hamowanie CBP/p300 może**

prowadzić do niepożądanych efektów ubocznych związanych z globalną represją transkrypcji?

W kolejnym badaniu Doktorantka wykazała, że I-CBP112 znacząco obniżył ekspresję genów transporterów ABC, takich jak ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC5, ABCG2, a także ABCC10 w komórkach potrójnie negatywnego raka piersi (MDA-MB-231) oraz ABCC4 w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuc (A549). W wyniku obniżenia ekspresji transporterów ABC, I-CBP112 zwiększył wewnątrzkomórkową akumulację leków przeciwnowotworowych, takich jak dokсорubicyna, daunorubicyna i metotreksat, co prowadziło do zwiększonej cytotoksyczności tych leków wobec komórek nowotworowych w hodowlach 2D i 3D. Dodatkowo, zastosowanie I-CBP112 prowadziło do polaryzacji ludzkich makrofagów w kierunku fenotypu prozapalnego M1, a I-CBP112 nie wykazywał toksyczności wobec pierwotnych linii komórkowych ani nie zwiększał toksyczności leków przeciwnowotworowych wobec komórek układu odpornościowego.

W dalszych etapach badań Doktorantka zastosowała inhibitory PARP-1, ponieważ enzym ten jest znanym partnerem koaktywatora transkrypcyjnego p300, w celu sprawdzenia, czy bierze on udział w regulacji ekspresji genów transporterów ABC zależnych od p300. Badania potwierdziły tę zależność — zahamowanie aktywności PARP-1 prowadziło do zmniejszenia ekspresji wybranych genów kodujących białka z rodziny transporterów ABC, co wskazuje, że PARP-1 uczestniczy w ich transkrypcyjnej regulacji. Ponadto, Doktorantka zidentyfikowała białko SMARCA1 jako istotny czynnik uczestniczący w regulacji ekspresji genów ABCC3 i ABCC4 w sposób zależny od PARP-1 i p300. Geny te kodują transportery, które odgrywają kluczową rolę w oporności wielolekowej, szczególnie po traktowaniu komórek nowotworowych linii MDA-MB-231 dokсорubicyną. W swojej pracy Doktorantka przytoczyła, że białko SMAR-

CA1 jest białkiem kompleksu typu SWI/SNF. **Proszę doktorantkę o analizę podjednostek kompleksów SWI/SNF i podanie ich składu, oraz do jakiego kompleksu należy SMARCA1.**

Należy podkreślić, że w swojej pracy Doktorantka posłużyła się szerokim repertuarem metod biologii molekularnej i komórkowej a przed wszystkim swoje wyniki zweryfikowała w hodowlach komórkowych nie tylko 2D ale także 3D. Obecnie hodowle 3D są coraz częściej używane w badaniach naukowych, gdyż lepiej oddają naturę komórek nowotworowych, które rosną w skupiskach i tworzą guzy. Ponadto, na podkreślenie również zasługuje fakt, że Doktoranta jest pierwszym autorem prac oryginalnych publikowanych w renomowanych pismach naukowych o zasięgu międzynarodowym oraz w pracy pogładowej dotyczącej aktywności inhibitorów CBP/p300 i ich funkcji w terapii przeciwnowotworowej.

Podsumowując uważam, że mgr Magdalena Strachowska osiągnęła stawiane sobie cele naukowe oraz, że rozprawa odpowiada wymogom Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668) stawianym pracom doktorskim. W związku z powyższym wnioskuję do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie mgr Magdaleny Strachowskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego oraz o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Wniosek o wyróżnienie pracy motywuję przekonaniem, że przedstawiona rozprawa doktorska jest doskonale udokumentowana pod względem merytorycznym i wyróżnia się zastosowaniem nowoczesnych metod biologii molekularnej oraz wysokim poziomem naukowym. Na szczególne uznanie zasługuje wnikliwa analiza mechanizmów oporności i przełamывania oporności wielolekowej w nowotworach, która stanowi podejście nowatorskie – od lat podejmowane w badaniach, lecz wciąż bez przełomowych osiągnięć klinicznych. W mojej ocenie strategia zaproponowana przez Doktorantkę ma realny potencjał do przyszłego zastosowania w praktyce klin-

icznej, w leczeniu pacjentów z różnymi typami nowotworów opornych na standardową chemioterapię.

KIEROWNIK
Pracownia Immunoterapii Eksperymentalnej

dr hab. Elżbieta Samowska
prof. Instytutu