

Łódź, dnia 08 stycznia 2026 roku

OCENA

pracy doktorskiej mgr Karoliny Gronkowskiej

pt. „Rola kompleksu SWI/SNF-EP300 w powstawaniu oporności komórek nowotworowych na chemioterapię”

Regulacja epigenetyczna ekspresji genów jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania komórek. Procesy te obejmujące przede wszystkim modyfikacje potranslacyjne ogonów histonów a także modyfikacje kwasów nukleinowych poprzez procesy metylacji i demetylacji DNA tworząc niezwykle dynamiczny i skoordynowany obraz kształtowania struktury chromatyny i regulowania ekspresji genów. Modyfikacje epigenetyczne odgrywają kluczową rolę w chorobie Alzheimera i innych chorobach neurodegeneracyjnych, nadciśnieniu, cukrzycy, POCHP, depresji, schizofrenii czy wreszcie w procesach rozwoju wielu typów nowotworów. W ostatnim przypadku indukowane mechanizmy epigenetyczne w komórkach rakowych często prowadzą do zwiększenia jego inwazyjności jak i oporności na chemioterapię. Podjęta w recenzowanej pracy doktorskiej tematyka wynika z aktywności naukowej, konsekwentnie realizowanej i rozwijanej od szeregu lat przez dr hab. Agnieszkę Robaszkiewicz w Katedrze Biofizyki Uniwersytetu Łódzkiego a dotyczącej badań nad przełamywaniem lekooporności nowotworów na poziomie genomu. Oryginalne wyniki badań grupy kierowanej przez dr hab. Agnieszkę Robaszkiewicz wykazały ścisły związek potranslacyjnych mechanizmów kształtujących chromatynę z ekspresją białek oporności wielolekowej z rodziny ABC i nabyciem cech chemiooporności przez komórki nowotworowe.

Praca doktorska magister Karoliny Gronkowskiej ma typowy układ a wstęp pracy poprzedza prezentacja dorobku naukowego doktorantki oraz jej aktywności naukowej, które można potraktować jako szczególny synopsis kariery naukowej Pani Karoliny Gronkowskiej. We wstępie teoretycznym obejmującym 17 stron doktorantka w sposób kompleksowy przedstawiła współczesny stan wiedzy i koncepcji na temat regulacji epigenetycznej oraz przedstawiła jej rolę w terapiach epigenetycznych przeciw nowotworom. W kolejnych

rozdziałach w sposób bardziej szczegółowy autorka przedstawiła aktywność białka p300 w komórkach nowotworowych oraz własną analizę zaburzeń ekspresji genu *EP300* w nowotworach. W drugiej części wstępu wyodrębniono fragmenty analizujące rolę kompleksu SWI/SNF jako koregulatora p300 w nowotworach, ze szczególnym uwzględnieniem ATPaz, BRG1 i BRM. Wstęp zamyka podrozdział demonstrujący związek pomiędzy ekspresją *EP300* a innymi regulatorami epigenetycznymi w nowotworach takimi jak acetylotransferazy i deacetylotransferazy histonowe, metylazy i demetylazy histonowe, enzymy modyfikujące DNA i RNA oraz elementy kompleksu SWI/SNF.

Celem ocenianej pracy doktorskiej jest poznanie roli kompleksu SWI/SNF-p300 w powstawaniu zjawiska chemiooporności nowotworów związanego z dwoma mechanizmami molekularnymi. Pierwsza hipoteza badawcza zakładała aktywny udział SWI/SNF-p300 w indukowaniu nadekspresji transporterów ABC we frakcji lizosomalnej, odpowiedzialnej za sekwestrację paklitakselu wewnątrz tych organelli i obniżenia terapeutycznego stężenia leku wewnątrz komórek nowotworowych. Drugą hipotezą badawczą postawioną przez doktorantkę było pytanie o rolę kompleksu SWI/SNF-EP300 w transkrypcyjnej aktywacji niektórych genów związanych z naprawą DNA w odpowiedzi na indukowaną przez cisplatynę aktywację szlaku ATM/ATR-CHK1/2-p53 i zmiany w profilu modyfikacji potranslacyjnych czynnika transkrypcyjnego E2F1. Tak szeroko zaprojektowane badania wymagały zastosowania szeregu właściwie dobranych technik badawczych, które obejmowały metody Western Blot, Real-time PCR, wieloparametryczne testy cytotoksyczności, mikroskopię konfokalną, cytometrię przepływową, sekwencjonowanie RNA, sekwencjonowanie Sangera, koimmunoprecypitację białek, immunoprecypitację chromatyny oraz bioinformatyczną analizę danych ChIP-seq, RNA-seq i danych klinicznych pacjentów onkologicznych. Metody opisano w sposób pozwalający na ocenę prawidłowości postępowania eksperymentalnego i w większości zostały zawarte w kopiach publikacji włączonych do rozprawy doktorskiej. Na podkreślenie zasługuje fakt, że obok podstawowych komórkowych linii niedrobnokomórkowego raka płuca A549 oraz potrójnie ujemnego raka piersi MDA-MB-231 doktorantka uzyskała i włączyła do badań komplementarne linie komórkowe odporne na paklitaksel. Co więcej, wyniki badań eksperymentalnych przeprowadzonych na hodowlach komórkowych 2D doktorantka potwierdziła przeprowadzając kluczowe eksperymenty z użyciem form sferycznych hodowli komórkowych A549 i MDA-MB-231. Doktorantka właściwie i swobodnie korzystała z dostępnego bogatego warsztatu metodycznego, instrumentalnego i odczynnikowego, planując właściwie eksperymenty z użyciem wielu

swoistych inhibitorów oraz narzędzi do wyciszania ekspresji między innymi transporterów rodziny ABCC, elementów kompleksu SWI/SNF, białek HIF1A, ATM, ATR, p53, HDAC, KDM5B, LSD1 i wielu innych. Szczególnie na uwagę zasługuje też sprawność z jaką doktorantka rozwiązywała napotkane w trakcie pracy niespodziewane problemy naukowe takie jak pojawienie się mutacji odwracającej kodon STOP i przywracającej ekspresję BRG1 w komórkach A549 opornych na paklitaksel.

Część doświadczalna liczy 79 stron. Uzyskane wyniki zaprezentowano na 32 rycinach. Doktorantka bardzo obszernie przeanalizowała literaturę światową i krajową co pozwoliło na szczegółową i kompetentną 8-stronicową dyskusję wyników własnych. W pracy doktorskiej wykorzystano łącznie 188 pozycji literaturowych, z których 109 pochodzi z lat 2020-2025. Przeprowadzone badania pozwoliły na uzyskanie szeregu wartościowych i interesujących danych i ustaleń, które podsumowano w formie dziewięciu znajdujących uzasadnienie w wynikach wnioskach. W oparciu o wyniki pierwszego etapu realizacji pracy doktorskiej doktorantka sformułowała i potwierdziła interakcje elementów kompleksu SWI/SNF, białka p300 i ATP-azy BRG1 z HIF1A, które definiują transkrypcję transporterów ABCC3, ABCC5 i ABCC10 w komórkach raka piersi i płuc. Efektem indukcji lub wzmocnienia tego mechanizmu jest rozwój oporności komórek nowotworowych na paklitaksel poprzez zależną od transporterów ABCC sekwestrację leku w lizosomach. W drugiej części pracy autorka zaprezentowała wnioski dotyczące indukcji chemiooporności w komórkach traktowanych cisplatyną. Ekspozycja komórek na cisplatynę powodowała oddzielenie p53 z kompleksów p53-p300-E2F1 związanymi z promotorami genów a w efekcie rekrutację p300 i uzyskanie struktury chromatyny umożliwiającej inicjację transkrypcji. Zwiększenie w ten sposób dostępności chromatyny dla kompleksu SWI/SNF i p300 aktywowało ekspresję DUSP12 i FANCI, których wysoka ekspresja jest związana z gorszą odpowiedzią na terapię związkami platyny u pacjentów.

Podczas studiowania pracy nasunęły mi się następujące pytania i uwagi, które kieruje do doktorantki:

- Czy doktorantka brała pod uwagę udział HIF1A w regulacji ekspresji transporterów innych niż transportery z rodziny ABCC na przykład ABCB1 w badanych modelach komórkowych? Na podstawie wyników przedstawionych na rycinach 7, 8 i 9 w komórkach opornych na paklitaksel najsilniej indukowane jest białko ABCB1 jak i też wykazuje najwyższy indeks kolokalizacji z lizosomami. W związku a tym pojawia się pytanie, które z typów transporterów ABC wydają się być bardziej istotne i w jakim stopniu w mechanizmie

chemiooporności na paklitaksel zależny od procesu sekwestracji leku w lizosomach w badanych modelach komórkowych? Czy mechanizm indukcji ABCB1 angażujący HIF1A w rozwijaniu oporności na paklitaksel może zachodzić równolegle z badanym przez doktorantkę regulacją osi HIF1A-p300-BRG1-ABCC?

- Analizując zdjęcia na rycinie 16 prezentujące wpływ zahamowania aktywności SWI/SNF oraz SMARCA2/4 PROTAC na ekspresję ABCC3, ABCC5 i ABCC10 zwraca uwagę fakt, że po dodaniu inhibitorów PFI-3 bądź ACBI1 obok spodziewanego spadku immunofluorescencji pochodzącej od przeciwciał rozpoznających transportery znacząco wyraźnie spada poziom fluorescencji pochodzącej od barwnika LysoTracker. Zaprezentowana analiza ilościowa potwierdziła znaczący spadek ekspresji transporterów, ale też obniżenie stopnia kolokalizacji transporterów ABCC3 i ABCC10 z lizosomami. Nasuwa się pytanie czy zastosowane inhibitory mogą także zaburzać powstawanie lizosomów a tym samym redukować ich rolę jako błonowy rezerwuuar ABCC3 i ABCC10 mogących aktywnie sekwestrować lek wewnątrz organelli.

- Proszę wyjaśnić w jaki sposób otrzymano populację komórek A549 opornych na paklitaksel wraz z mutacją odracającą kodon STOP dla białka BRG1. Zgodnie z opisem metodycznym zawartym w prezentowanej pracy doktorskiej oraz publikacji doktorantki z 2023 roku w Cellular Physiology and Biochemistry hodowla A549 była poddawana co 3 tygodnie 48 godzinnej ekspozycji na paklitaksel. Po 6 takich cyklach uznano, że uzyskano komórki odporne z nadekspresją transporterów z rodziny ABC. Z opisu nie wynika, iż hodowlę komórek opornych na paklitaksel zawierających mutację wyprowadzono z pojedynczych komórek. Czy należy przyjąć, że mutację odracającą kodon STOP dla białka BRG1 nabyła jedna lub więcej komórek i w trakcie selekcji paklitakselem klony tych komórek zdominowały hodowlę? Czy udało się doktorantce powtórnie otrzymać komórki A549 z tą mutacją po ekspozycji na paklitaksel?

Po lekturze rozprawy doktorskiej Pani mgr Karoliny Gronkowskiej stwierdzam, że praca prezentuje bardzo wysoki poziom merytoryczny. Sformułowanie koncepcji pracy oraz wniosków nie budzą zastrzeżeń. Badania przeprowadzono zgodnie z ambitnie postawionymi celami, doświadczenia zaplanowano właściwie i zrealizowano za pomocą odpowiednich, i co należy szczególnie podkreślić bardzo nowoczesnych technik badawczych i bioinformatycznych, a uzyskane wyniki dobrze udokumentowane i zinterpretowane wnoszą nowe dane na temat powstawania oporności komórek nowotworowych na chemioterapię. Podsumowując, przedstawiona mi do oceny praca jest bardzo wartościowym i oryginalnym dorobkiem naukowym Doktorantki i Promotora i w pełni odpowiada warunkom stawianym rozprawom doktorskim określonym w art. 187 ust. 1 i 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2022 r. poz. 574). Wnoszę zatem do Wysokiej Komisji UŁ ds. stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie mgr Karoliny Gronkowskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Dr hab. n. med. Waldemar Wagner