

Dr hab. Agnieszka Wolnicka-Głubisz, prof. UJ
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Zakład Biofizyki i Biologii Nowotworów



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Kraków, 9.04.2025

Recenzja
rozprawy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Strachowskiej
zatytułowanej
“Przelamywanie oporności wielolekowej nowotworów na poziomie
genomu: opracowanie metody zapobiegającej nadekspresji
transporterów ABC w komórkach nowotworowych opartej na
inhibitorach enzymów remodelujących chromatynę“
wykonanej pod kierunkiem
Pani dr hab. Agnieszki Robaszkiewicz, prof. UŁ

Wydział Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii

Dr hab. Agnieszka
Wolnicka-Głubisz, prof. UJ

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr. Magdaleny Strachowskiej jest zbiorem tematycznie spójnych czterech artykułów opublikowanych w latach 2021-2024 w *Cancers*, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *Pharmacology & Therapeutics* i *Postęпах Biochemii*, co wypełnia art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, tekst jednolity Dz.U. z 2021 r. poz. 478.

Rozprawa przygotowana w języku polskim składa się z trzynastu rozdziałów obejmujących: Źródła finansowania (1strona), Dorobek naukowy, Patenty, Staże zagraniczne (4 strony), Wstęp (4,5 strony), Cel pracy i Hipotezy badawcze (1,5 strony), Materiały i metody (8 stron), Omówienie wyników (21 stron), Wnioski (0,5 strony), Literatura (18 pozycji), Streszczenie w języku polskim (2 strony), Streszczenie w języku angielskim (2 strony), oraz załączników (kopie publikacji i oświadczenia o współautorstwie i współautorów).

We wstępie Doktorantka krótko i zwięźle przedstawia stan wiedzy na temat oporności komórek nowotworowych na chemioterapie i mechanizmów adaptujących je do przeżycia w warunkach toksycznych /stresowych, a w szczególności nadekspresji białek ABC skutkujących nawrotem choroby i nabyciem chemoodporności.

ul. Gronostajowa 7
30-387 Kraków
tel. +48(12) 664 6526
fax +48(12) 664 69 02
email: a.wolnicka-
glubisz@uj.edu.pl

Przewycięzanie oporności wielolekowej nowotworów opornych na standardową chemioterapię pozostaje wyzwaniem dla wielu klinicystów, a poznanie jej molekularnych mechanizmów stanowi ważny przyczynek do zwalczania nawrotów choroby nowotworowej, dlatego praca doktorska pani mgr Magdaleny Strachowskiej jest niezwykle aktualna i ważna. Stan wiedzy w zakresie mechanizmów regulujących transkrypcję, wewnątrzkomórkową lokalizację białek ABC i działań ich potencjalnych inhibitorów w komórkach nowotworowych opornych na działanie chemioterapii pozostaje nadal niepełny, stąd też wyniki badań uzyskane przez panią mgr Starachowską uważam za cenne, poszerzające aktualną wiedzę z zakresu biologii nowotworów.

Badania te wpisują się też ściśle w aktualne kierunki badawcze, o czym świadczy m.in. finansowanie uzyskane z Narodowego Centrum Nauki w konkursie Preludium 21, w którym Doktorantka pełniła rolę kierownika oraz z Narodowego Centrum Badań i Rozwoju w konkursie LIDER, którego kierownikiem była Pani dr hab. Agnieszka Robaszkiewicz, prof. UŁ. Doktoranta otrzymała też finansowanie stażu zagranicznego w Laboratorium Loranta Szekvolgyi, Uniwersytet w Debreczynie, Węgry w ramach programu PROM2023.

Doktorantka jasno i precyzyjnie sformułowała cel pracy, którym była ocena roli p300 w wytwarzaniu oporności wielolekowej na wybrane chemoterapeutyki poprzez nasilenie transkrypcji genów z rodziny ABC. Sformułowała dwie hipotezy badawcze, nadrzędną, która zakładała możliwość uzupełniania standardowej chemioterapii o I-CBP112, związek będący inhibitorem p300, w celu hamowania transkrypcji genów kodujących białka ABC oraz dodatkową, która zakładała udział kompleksu PARP1/HPF1 w regulowaniu transkrypcji tychże genów. **Należy zauważyć, że cel ten został zrealizowany, a hipotezy potwierdzone doświadczalnie.**

Doktorantka jako model badawczy wybrała trzy nowotworowe linie komórkowe: MDA-MB-231 (TNBC; potrójnie ujemny rak piersi, pod względem ekspresji receptorów estrogenowych i progesteronowych oraz białka HER2), A549 (niedrobnokomórkowy rak płuc) i HepG2 (hepatoblastoma, rak wątrobowokomórkowy) różniące się poziomem

ekspresji transporterów ABC, oraz komórki prawidłowe (monocyty/makrofagi).

Wyniki przedstawione w formie opisowej opierają się o dwie prace eksperymentalne, w których Doktorantka jest pierwszym autorem. Należy jednak zaznaczyć, że nie są to jedyne prace Doktorantki, która wg załączonego CV ma na swoim koncie jeszcze cztery inne prace o łącznym IF ponad 39, liczne komunikaty zjazdowe i współautorstwo w patencie.

Biorąc pod uwagę fakt, że stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej prace przeszły przez krytyczny systemem oceny *peer-review* podczas publikacji w recenzowanych czasopismach z listy *Journal Citation Reports*, można być pewnym, że opublikowane badania są oryginalne, mają wpływ na rozwój dyscypliny naukowej i są zgodne z najlepszymi praktykami w danej dziedzinie.

W pracy badawczej z roku 2021 pt. *"CBP/p300 Bromodomain Inhibitor-I-CBP112 Declines Transcription of the Key ABC Transporters and Sensitizes Cancer Cells to Chemotherapy Drugs"*, Autorka wykazała, że indukowany przez I-CBP112 spadek ekspresji wszystkich badanych ABC w liniach komórkowych raka piersi, płuc i wątroby zwiększał akumulację doksorubicyny, daunorubicyny i metotreksatu wewnątrz komórek, oraz znacznie zwiększał wrażliwość komórek na szeroki zakres chemioterapeutyków. Ponadto promotory genów represjonowane przez I-CBP112 w komórkach MDA-MB-231, takie jak ABCC1 i ABCC10, charakteryzowały się zwiększoną acetylacją nukleosomów i jednocześnie znacznie niższą trimetylacją w promującej transkrypcję formie H3K4me3. Inhibitor bromodomeny CBP/p300 indukował rekrutację LSD1 do promotorów genów. Zahamowanie tej demetylasy w obecności I-CBP112 zapobiegło represji ABCC1 i ABCC10 oraz, w znacznym stopniu, uwrażliwieniu komórek nowotworowych na leki.

W pracy badawczej z 2023 roku zatytułowanej „*I-CBP112 declines overexpression of ATP-binding cassette transporters and sensitized drug-resistant MDA-MB-231 and A549 cell lines to chemotherapy drugs*”

Autorka obserwowała, że I-CBP112 znacząco zmniejszył ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC5 i ABCG2 we wszystkich opornych liniach, a także ABCC10 w TNBC i ABCC4 w A549 opornym na

paklitaksel, zwiększając w ten sposób wewnątrzkomórkową akumulację leku i cytotoksyczność w hodowlach 2D i 3D. Jednak zjawisko to było obserwowane tylko przez łączny efekt inhibitorów ABC, takich jak tariquidar i MK-571. Pojedyncze hamowanie białek ABCB1/ABCG2 lub ABCC nie wpływało na akumulację leku, co sugeruje potrzebę jednoczesnego niedoboru aktywności większości pomp lekowych w celu zwiększenia retencji leku. Choć nie udało się bezpośrednio zahamować aktywności członków podrodziny ABCB1, ABCG2 i ABCC w tym samym czasie przez I-CBP112, to komórki nowotworowe traktowane I-CBP112 indukowały polaryzację ludzkich makrofagów do fenotypu prozapalnego, a sam inhibitor nie wykazywał toksyczności względem pierwotnych komórek odpornościowych krwi. Pożądane właściwości farmakokinetyczne ADMET (wchłanianie, dystrybucja, metabolizm, wydalanie, toksyczność) dla I-CBP112 potwierdzono badaniem *in silico*.

W pracy przeglądowej z roku 2024 pt. "Poliploidia jako rezultat terapii przeciwnowotworowych i przyczyna braku ich skuteczności" Autorska opisuje poznane dotychczas mechanizmy odpowiedzialne za powstawanie komórek poliploidalnych, ich główne cechy i rolę w nawrotach raka oraz obecnie rozważane podejścia terapeutyczne celujące w metabolizm i ścieżki sygnałowe, które są niezbędne do funkcjonowania komórek poliploidalnych.

W pracy przeglądowej pt. „Characteristics of anticancer activity of CBP/p300 inhibitors - Features of their classes, intracellular targets and future perspectives of their application in cancer treatment” Autorka opisuje rolę acetylotransferaz CBP i p300 jako potencjalne epigenetyczne cele terapii przeciwnowotworowej, przedstawia charakterystykę aktywności przeciwnowotworowej inhibitorów CBP/p300 - cechy ich klas, cele wewnątrzkomórkowe i przyszłe perspektywy ich zastosowania w leczeniu nowotworów.

Do najważniejszych i jednocześnie bardzo ciekawych wyników pracy doktorskiej Pani mgr. Magdaleny Strachowskiej zaliczyć należy:

- Wykazanie, że I-CBP112 hamuje działanie CBP/p300, co w konsekwencji obniża ekspresję białek ABC również w liniach z

nabytą opornością wielolekową a jednocześnie nie wykazuje cytotoksyczności względem komórek prawidłowych, co sprawia, że jest to związek o potencjalnym wykorzystaniu do terapii skojarzonej.

- Wykazanie, że SMARCA1 ogrywa rolę w PARP-1/p300 – zależnej ekspresji transporterów ABCC3 i ABCC4.
- Pokazanie, że białka ABCC3 i ABCC4 ogrywają istotną rolę w uzyskanej oporności na doksorubicynę komórek TNCB

Wnioski są dobrym podsumowaniem pracy, choć szkoda, że Autorka nie pokusiła się o napisanie planu dalszych badań czy perspektyw. Wniosek, że transportery ABC ogrywają istotną rolę w oporności komórek nowotworowych na chemioterapeutyki jest znanym stwierdzeniem, więc powinien być sformułowany jako potwierdzenie wcześniejszych doniesień literaturowych.

Uwagi

W załączonych pracach, które zostały opublikowane wraz z dodatkowymi materiałami w postaci suplementów, brakuje suplementów. Te dodatkowe materiały także powinny być dołączone do pracy.

Brakuje dyskusji obejmującej wszystkie uzyskane wyniki zwłaszcza, że w pracy umieszczono dodatkowe wyniki (17 rycin). W opinii recenzenta „dyskusja” to bardzo ważny rozdział, pomimo, że każda z publikacji posiada odrębną dyskusję. Dyskusja powinna zwierać koncepcje pracy naukowej i stanowić logiczne ich następstwo, co też wskazuje czy Autor dysertacji potrafi w sposób spójny przedstawić wspólną analizę wszystkich uzyskanych wyników badań. Podjęcie próby przedyskutowania wszystkich zebranych wyników potwierdziłoby dojrzałość naukową Doktorantki.

Nie poprawne jest stosowanie słowa „figura” to anglicyzm powinno się raczej wykorzystywać polskie słowa „rysunek” czy „rycina”. Drobne literówki, np. „na ekspresji” str.15, błędy stylistyczne

„wygenerowane wyniki” powinno być raczej „otrzymane wyniki”,
„Oceniono także bezpieczeństwo badanego związku” .

Liczba miejsc po przecinku uznawana za istotną to maksymalnie 3,
a w przypadku dwucyfrowej liczby 2, itp.

Nie podano które linie pierwotne zakupiono w ATCC. Obecnie
nazwę linii komórkowej podaje się z symbolem Cellosaurus np. MDA-
MB-231 (CVCL_0062), dobrze byłoby też podać datę zakupu linii
komórkowych.

Należy zaznaczyć, że przedstawione powyżej uwagi dotyczą
w większości formy i sposobu opisu uzyskanych wyników, a nie aspektu
merytorycznego omawianej pracy.

**Uważam, że praca doktorska Pani mgr. Magdaleny Strachowskiej
przedstawia oryginalne wyniki badań o dużym znaczeniu i jakości,
oraz wnosi istotne informacje na temat przełamывania oporności
wielolekowej nowotworów.**

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia
warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o
szkolnictwie wyższym i nauce, tekst jednolity Dz.U.z 2021 r. poz. 478
i przedkładałam Komisji ds. Stopni Naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i
przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne Uniwersytetu Łódzkiego
wniosek o dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Strachowskiej do dalszych
etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk
ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

**Jednocześnie, z uwagi na wysoki poziom merytoryczny pracy,
zastosowanych metod i narzędzi badawczych, uzyskanie patentu, oraz
opublikowanie prac w oparciu o wyniki prezentowane w rozprawie
doktorskiej w czasopismach wysoko punktowanych przez MEiN (140
i 200 pkt.), w których Doktorantka jest pierwszym autorem wnoszę o
wyróżnienie pracy.**

Dr hab. Agnieszka Wolnicka-Głubisz, prof. UJ