

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pana mgr. Macieja Sobczaka

pt. *„Epigenetyczne mechanizmy regulujące proliferację i oporność komórek nowotworowych na leczenie cytostatykami w badaniach in vitro oraz in silico”*

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pana mgr. Macieja Sobczaka została wykonana pod kierunkiem naukowym Pani dr hab. Agnieszki Robaszkiewicz, Prof. UŁ w Katedrze Biofizyki Ogólnej Instytutu Biofizyki Uniwersytetu Łódzkiego, natomiast Pan dr Tomasz Płoszaj (Zakład Genetyki Klinicznej, Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny w Łodzi) pełnił rolę promotora pomocniczego. Praca doktorska była finansowana z dwóch źródeł zewnętrznych, tj. grantu NCN w ramach konkursu Sonata DEC-2013/11/D/NZ2/00033 pt. *„Transkrypcyjno-epigenetyczna rola polimerazy poli(ADP-rybozy)-1 w warunkach ekspresji czynników prozapalnych kontrolowanych przez oś NF-κB w mieloidalnych komórkach efektorowych”* oraz grantu NCBR w ramach konkursu LIDER/22/0122/L-10/18/NCBR/2019 pt. *„Przełamywanie oporności wielolekowej nowotworów na poziomie genomu: opracowanie metody zapobiegającej nadekspresji transporterów ABC w komórkach nowotworowych opartej na inhibitorach enzymów remodelujących chromatynę”*, których kierownikiem była Pani Promotor dr hab. Agnieszka Robaszkiewicz, Prof. UŁ. Ponadto, praca doktorska została przygotowana w ramach projektu „InterDOC-STARt – Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie na Wydziale BiOŚ UŁ (POWR.03.02.00-IP.08-00-DOK/16, Program Operacyjny Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020, Oś priorytetowa III. Szkolnictwo wyższe dla gospodarki i rozwoju, działanie 3.2 Studia doktoranckie, którego kierownikiem była Pani Prof. dr hab. Agnieszka Marczak.

Doktorant postawił sobie za cel swoich badań wyjaśnienie molekularnych mechanizmów modulujących proliferację oraz odpowiedź na uszkodzenia DNA, a także warunkujących nabywanie oporności wielolekowej przez komórki nowotworowe, a w szczególności określenie roli kompleksu BRG1-EP300, białka PARP-1, kompleksu CoREST oraz p53 w epigenetycznej regulacji wyżej wymienionych procesów komórkowych. W opinii recenzenta podjęta tematyka badawcza jest bardzo ważna i interesująca, a problem oporności wielolekowej w terapii przeciwnowotworowej i jego podłoże molekularne zasługują na pogłębione, wnikliwe analizy mogące dostarczyć potencjalnych nowych rozwiązań terapeutycznych.

Praca doktorska Pana mgr. Macieja Sobczaka stanowi zbiór czterech powiązanych tematycznie artykułów naukowych opublikowanych w latach 2019-2022, co spełnia wymagania określone w art. 187 ust. 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z dnia 30 sierpnia 2018 r., poz. 1668, z późniejszymi zmianami). Są to trzy oryginalne artykuły naukowe opublikowane w czasopiśmie naukowym o zasięgu międzynarodowym *Cancers* oraz jeden artykuł przeglądowy opublikowany w krajowym czasopiśmie *Postępy Biochemii*:

Sobczak M, Pitt AR, Spickett CM, Robaszkiewicz A. PARP1 Co-Regulates EP300-BRG1-Dependent Transcription of Genes Involved in Breast Cancer Cell Proliferation and DNA Repair. *Cancers (Basel)*. 2019 Oct 11;11(10):1539. doi: 10.3390/cancers11101539.

Sobczak M, Pietrzak J, Płoszaj T, Robaszkiewicz A. BRG1 Activates Proliferation and Transcription of Cell Cycle-Dependent Genes in Breast Cancer Cells. *Cancers (Basel)*. 2020 Feb 4;12(2):349. doi: 10.3390/cancers12020349.

Sobczak M, Strachowska M, Robaszkiewicz A. Udział kompleksów SWI/SNF opartych na aktywności BRG1 w determinowaniu fenotypu komórek nowotworowych [Contribution of BRG1-dependent SWI/SNF complexes to determining the phenotype of cancer cell]. *Postępy Biochem*. 2020 Mar 23;66(1):10-18. Polish. doi: 10.18388/pb.2020_312.

Sobczak M, Strachowska M, Gronkowska K, Robaszkiewicz A. Activation of ABCC Genes by Cisplatin Depends on the CoREST Occurrence at Their Promoters in A549 and MDA-MB-231 Cell Lines. *Cancers (Basel)*. 2022 Feb 11;14(4):894. doi: 10.3390/cancers14040894.

Rozprawa doktorska zawiera informacje o źródłach finansowania, dorobku naukowym, odbytych stażach zagranicznych oraz podrozdziały „Wstęp”, „Cel pracy”, „Materiały i metody”, „Omówienie wyników”, „Wnioski”, „Literatura”, „Streszczenie w języku polskim”, „Streszczenie w języku angielskim” oraz załączniki stanowiące kopie publikacji włączonych do rozprawy wraz z oświadczeniami Doktoranta oraz współautorów tychże publikacji. Układ pracy jest typowy dla tego typu opracowań. Podrozdziały są przygotowane starannie i rzetelnie. Uwzględniono adekwatną literaturę przedmiotu. Role Doktoranta oraz współautorów zostały precyzyjnie zdefiniowane podając dokładne autorstwo wyników prezentowanych na poszczególnych rycinach w publikacjach, udział w analizie danych, interpretacji wyników czy przygotowaniu manuskryptu. Recenzent nie ma wątpliwości, że rola Doktoranta w powstanie wyżej wymienionych publikacji była istotna i wiodąca. Doktorant jest również pierwszym autorem w każdej z czterech wymienionych publikacji, co również świadczy o jego znaczącym wiodącym udziale. W opinii recenzenta, został w pełni spełniony ustawowy wymóg

samodzielnego rozwiązania problemu naukowego. Doktorant oszacował również swój udział procentowy jako odpowiednio 60, 40, 85 oraz 70%. W opinii recenzenta, takie szacowane jest problematyczne, gdyż nie ma dostępnych metodologicznych narzędzi mogących w sposób obiektywny i jednoznaczny określić udział procentowy poszczególnych współautorów publikacji. I tak przykładowo, precyzyjny, szczegółowy opis udziału Promotora pomocniczego Pana dr Płoszaja kontrastuje z jego deklaracją o procentowym udziale na poziomie zaledwie 1% (doi: 10.3390/cancers12020349). Zatem precyzyjny opis udziału poszczególnych współautorów jest wystarczający do oceny wiodącego wkładu Doktoranta, a szacowanie procentowe mogłoby być pominięte, gdyż jest zabiegiem często intuicyjnym o zabarwieniu subiektywnym.

Recenzent bardzo wysoko ocenia wartość naukową wyników opublikowanych w trzech artykułach oryginalnych. Warto podkreślić, iż wyniki te zostały już uprzednio odpowiednio ocenione przez międzynarodową naukową radę redakcyjną oraz anonimowych recenzentów zagranicznych. Doktorant zastosował adekwatną metodologię, tj. nowoczesne narzędzia biologii molekularnej, biologii komórki, biochemii czy bioinformatyki w celu weryfikacji hipotez badawczych oraz realizacji celów ogólnych i szczegółowych. Taki szeroki wachlarz metod i narzędzi badawczych świadczy o bardzo dobrym warsztacie Doktoranta. Użyto dwa modele komórkowe nowotworu *in vitro* - komercyjnie dostępne nowotworowe linie komórkowe – komórki nowotworu płuc A549 oraz nowotworu piersi MDA-MB-231. Do pewnych eksperymentów użyto również komórki nowotworu piersi MCF-7. Wybór modeli komórkowych został adekwatnie uzasadniony. Do badania molekularnego podłoża (epigenetycznej regulacji) lekooporności wybrano traktowanie cisplatyną. Porównano efekty w komórkach zarówno wrażliwych, jak i opornych na działanie cisplatyny. Rola wybranych molekularnych regulatorów epigenetycznych została określona stosując dwa podejścia metodyczne – farmakologiczne (inhibitory) oraz genetyczne (technologia oparta na siRNA). Otrzymane wyniki badań pozwoliły na wyciągnięcie wielu interesujących wniosków. W opinii recenzenta, najistotniejsze wnioski przedstawiono poniżej.

- 1) Regulacja ekspresji genów związanych z proliferacją oraz naprawą DNA w komórkach nowotworu piersi uwarunkowana jest aktywnością kompleksu BRG1-EP300. Regulacja ta realizowana jest na dwa sposoby – bezpośredni oraz pośredni. Po pierwsze, mechanizm bezpośredni zakłada, że kompleks BRG1-EP300 może wiązać się do regionów promotorowych genów, co skutkuje acetylacją reszt lizyny histonów przez

EP300 i ich rozpoznawaniem przez BRG1. Acetylowane histony są usuwane, co przyczynia się do zmian konformacyjnych promujących transkrypcję. Po drugie, regulowana może być transkrypcja genów E2F-zależnych. Promowanie transkrypcji genów warunkujących podziały komórkowe przez BRG1-EP300 może przyczyniać się również pośrednio do stymulacji transkrypcji genów, które są regulowane przez grupę czynników E2F.

- 2) Białko PARP1 może wpływać na funkcjonalność kompleksu BRG1-EP300. Zależna od PARP1 ADP-rybozylacja EP300 może modulować aktywność acetylowania reszt histonowych przez EP300 w regionach promotorów genów *LIG1*, *NEIL3* oraz *CDK4*.
- 3) W komórkach A549 oraz MDA-MB-231 opisano nowe molekularne podłoże nabywania lekooporności poprzez epigenetyczną regulację ekspresji genów transporterów ABC. Po traktowaniu cisplatyną, p53 pośredniczy w rekrutacji EP300 do regionów promotorowych genu *ABCC10*, co promuje jego ekspresję i wyrażanie fenotypu oporności komórek nowotworowych na cisplatynę. W przypadku obecności kompleksu CoREST w regionach promotorowych genów kodujących *ABCC3* (komórki A549) oraz *ABCC4* (komórki MDA-MB-231), nie obserwuje się w komórkach opornych na cisplatynę przyłączania się EP300, co skutecznie zapobiega promowaniu ekspresji wyżej wymienionych genów transporterów ABC.
- 4) Kompleks CoREST jest kluczowym negatywnym regulatorem ekspresji wybranych genów transporterów ABC. Po traktowaniu cisplatyną, obecność p53 jest istotna dla wiązania się EP300 do regionów promotorowych genów nieulegających represji przez kompleks CoREST.

Podsumowując, Doktorant opisał nowy mechanizm nabywania lekooporności oraz nowy mechanizm regulacji ekspresji genów w komórkach nowotworowych, co stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnienie warunku ustawowego stawianego pracom doktorskim.

Doktorant nie ustrzegł się pewnych drobnych błędów stylistycznych wynikających z nadużywania żargonu laboratoryjnego czy innych błędów językowych i literówek, co oczywiście nie rzutuje na moją bardzo wysoką ocenę merytoryczną niniejszej pracy. Z obowiązku recenzenta, przedstawiam pewne przykłady: „wizualizowałem otrzymane wyniki” (strona 7), „jednym z leków, z zastosowaniu którego” (strona 9), „punkty wyjścia dla nowych terapii przeciwnowotworowej” (strona 9), „w butelkach hodowlanych o powierzchni 25 cm³” (strona 11), „W celu porównania efektu inhibicji wybranych enzymów z efektem

spowodowanym inhibicją CDK4/6 na ekspresję genów, które podlegają transkrypcyjnej regulacji przez BRG1-EP300. W tym celu(...)” (strona 14), *„zademonstrować stałość mechanizmu”* (strona 15), *„cisplatinę”* (strona 16), *„demonstruje Figura 1”* (strona 18), *„wyniki zilustrowano na figurach”* (oświadczenia).

Po wnikliwym zapoznaniu się z załączonymi kopiami artykułów naukowych stanowiących podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej, recenzentowi nasuwa się kilka pytań.

- 1) Pewny niedosyt budzi tytuł pracy traktujący o *„leczeniu cytostatykami”* i prezentacja wyników dotyczących epigenetycznej regulacji nabywania oporności tylko na cisplatinę. Czy Doktorant badał/bada również podobne mechanizmy w odniesieniu do innych klasycznych chemioterapeutyków? Czy Doktorant może skomentować to zagadnienie w oparciu o dostępną literaturę?
- 2) Czy nabywanie oporności na cisplatinę/wrażliwość na cisplatinę i leżące u ich podstaw molekularne mechanizmy były konfrontowane ze statusem receptorów w przypadku zastosowania modelu komórkowego nowotworu piersi? Czy Doktorant porównywał obserwowane efekty także w komórkach z nadreprezentacją HER2, np. SK-BR-3? A jeśli nie, to czy Doktorant może skomentować to zagadnienie w oparciu o posiadaną wiedzę? Czy zmieniona aktywność szlaku PI3K/AKT może mieć w tym przypadku jakiegokolwiek znaczenie?
- 3) Czy po traktowaniu cisplatiną Doktorant obserwował w komórkach nowotworowych indukcję procesu starzenia indukowanego chemioterapią? Z uwagi, iż jest to proces rozpatrywany jako efekt uboczny chemioterapii promujący pewne niekorzystne efekty w samych komórkach nowotworowych, ale także w mikrośrodkowisku guza, czy w organizmie człowieka jako całości, czy może Doktorant skomentować jakie byłyby ewentualne konsekwencje aktywacji ścieżki starzenia w jego układach eksperymentalnych? Czy starzenie komórkowe może modulować opisaną przez Doktoranta regulację epigenetyczną?
- 4) Jako, że Doktorant stosował rutynowo transfekcję przejściową w oparciu o technologię siRNA do wyciszania konkretnych genów, czy Doktorant uważa, że zastosowanie transfekcji stabilnej w połączeniu np. z narzędziem CRISPR/Cas9 promowałoby podobne efekty?

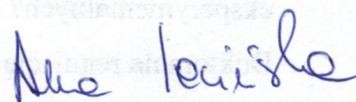
- 5) Proszę skomentować użyteczność otrzymanych przez Doktoranta wyników w kontekście projektowania nowych terapii przeciwnowotworowych. Jakie interwencje terapeutyczne można byłoby rozważyć?

Wniosek końcowy

Podsumowując, pomimo drobnych uwag krytycznych, bardzo wysoko oceniam rozprawę doktorską Pana mgr. Macieja Sobczaka. Praca doktorska spełnia wymagania formalne określone w art. 187 ust. 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z dnia 30 sierpnia 2018 r., poz. 1668, z późniejszymi zmianami). Rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktoranta w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne oraz potwierdza umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez Doktoranta. W związku z powyższym, zwracam się do Komisji ds. Stopni Naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne UŁ o dopuszczenie Pana mgr. Macieja Sobczaka do publicznej obrony rozprawy doktorskiej. Z uwagi na wysoką wartość merytoryczną prezentowanych wyników badań, zastosowanie licznych metod biologii molekularnej, biologii komórki czy narzędzi bioinformatycznych oraz opublikowanie wyników w postaci trzech oryginalnych artykułów naukowych w czasopiśmie naukowym o zasięgu międzynarodowym z wiodącą rolą Doktoranta (pierwszy autor), wnoszę również o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.

Rzeszów, 3.06.2022

dr hab. Anna Lewińska, Prof. UR



Uniwersytet Rzeszowski
Kolegium Nauk Przyrodniczych
Instytut Biologii i Biotechnologii
Katedra Biotechnologii
Pigonia 1, 35-310 Rzeszów