

Prof. dr hab. Jerzy Ciesiolka
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
ul. Noskowskiego 12/14
61-704 Poznań
e-mail: jerzy.ciesiolka@ibch.poznan.pl

Poznań, dnia 21 marca 2022 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Barbary Łasut-Szyszką pt.: Identyfikacja nowych genów regulowanych przez przeciwnowotworowe białko p53.

Rozprawa doktorska mgr Barbary Łasut-Szyszką wykonana została pod kierunkiem prof. dr hab. Marka Rusina w Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów im. Prof. Mieczysława Chorażego, Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego, Oddział w Gliwicach. Promotorem pomocniczym rozprawy był dr Artur Zajkowicz.

Gen i białko p53 są bardzo intensywnie badane w wielu laboratoriach już od ponad 40 lat. Białko p53 jest jednym z głównych czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych za homeostazę komórki i odpowiedź komórkową na stres. Ponadto, dobrze udokumentowano, że większość mutacji w genie *TP53* powoduje rozwój procesu nowotworowego. Ostatnie badania skupiają się na wyjaśnianiu, jak ekspresja białka p53 jest modulowana i powiązana z innymi procesami w komórce. Na tym kierunku badań od szeregu lat działa grupa badawcza kierowana przez prof. dr hab. Marka Rusina. Grupa ta, w szczególności, prowadzi badania procesu synergistycznej aktywacji p53 przez aktynomycynę D i nutlinę-3a. Recenzowana rozprawa doktorska wpisuje się w tą ważną dla badań p53 problematykę badawczą.

Rozprawa doktorska mgr Barbary Łasut-Szyszką liczy 194 strony, ma układ tradycyjny i podzielona jest na następujące, zasadnicze części: *Wstęp teoretyczny* (37 stron), *Materiały i metody* (33 strony), *Wyniki* (74 strony) oraz *Dyskusja z Podsumowaniem i Kierunkami dalszych badań* (20 stron). Po *Wstępie* do rozprawy Autorka przedstawiła na dwóch stronach *Przesłanki do podjęcia badań oraz cele pracy*, a po rozdziale *Dyskusja* zamieściła jedno-stronnicowe *Wnioski*. Rozprawa zawiera także *Streszczenie* w wersji polsko- i anglojęzycznej, *Wykaz stosowanych skrótów* oraz *Bibliografię* liczącą 260 pozycji cytowanej literatury źródłowej.

Wstęp teoretyczny rozprawy podzielony został na 13 podrozdziałów. W dziesięciu z nich mgr Barbara Łasut-Szyszką opisała historię odkrycia genu *TP53* i kodowanego przez niego białka oraz jego rolę funkcjonalną jako supresora procesu nowotworowego. Szczególną uwagę poświęciła mechanizmowi działania białka p53 na poziomie transkrypcji i przeglądowi dotychczasowej wiedzy na temat szerokiego spektrum genów regulowanych przez p53. Opisała także czynniki aktywujące p53 w komórce, mechanizmy regulacji poziomu tego białka oraz modyfikacje potranslacyjne. W tym przeglądzie znalazły się również informacje na temat izoform białka p53 i aktualnych poglądów dotyczących ich znaczenia funkcjonalnego. Informacje te są jednak ograniczone, a mechanizm powstawania izoform przedstawiony skrótowo. Należy przy tym zauważyć, że do powstawania różnych izoform prowadzi także translacja mRNA p53 zachodząca z alternatywnych kodonów inicjacyjnych, a nie tylko alternatywny splicing, wymieniony w

rozprawie. Etap translacji mRNA i działające na tym poziomie białka jest jednym z poziomów regulacji ekspresji genu *TP53*. Trzy ostatnie podrozdziały tej części rozprawy są bezpośrednio związane z badaniami prowadzonymi przez Doktorantkę. W pierwszym z nich dokonała szerokiego przeglądu baz danych oraz oprogramowania komputerowego pomocnych w poszukiwaniu genów zależnych od p53. W kolejnych dwóch podrozdziałach opisała układ doświadczalny stosowany w rozprawie do synergistycznej aktywacji p53 przez aktynomycynę D i nutlinę-3a oraz udział kinazy syntazy glikogenu-3 (GSK3) w regulacji szlaku p53 oraz innych ścieżek sygnałowych. Sądzę, że wstęp teoretyczny rozprawy przygotowany został przez Doktorantkę bardzo kompetentnie. Na szczególne podkreślenie zasługuje krytyczna ewaluacja różnych metod badawczych i różnych systemów wykorzystywanych w badaniach p53. Opracowanie zawiera kilka przygotowanych przez Doktorantkę rycin podsumowujących opisywane dane literaturowe (ryciny nr 9, 10, 12).

Głównym celem rozprawy mgr Barbary Łasut-Szyska, wskazanym w rozdziale *Przesłanki do podjęcia badań oraz cele pracy*, była identyfikacja nieznanych wcześniej genów regulowanych przez białko p53 oraz lepsze zrozumienie funkcjonowania szlaku sygnalizacyjnego zależnego od tego białka w warunkach traktowania komórek aktynomycyną D i nutliną-3a. Przesłanką do podjęcia się tych badań były wcześniejsze wyniki badań transkryptomicznych wskazujące, że aktywacja białka p53 przez aktynomycynę D i nutlinę-3a prowadzi do wzrostu ekspresji ponad 2000 genów, z których jedynie część była wcześniej znana jako cele biologiczne białka p53. Do szczegółowej analizy wybrano geny, charakteryzujące się silnym wzrostem indukowanej ekspresji, obecnością przypuszczalnego miejsca wiązania p53 w pobliżu miejsca startu transkrypcji oraz stosunkowo niewielką ilością danych literaturowych wiążących je z regulacją ekspresji przez p53. Podjęto również próbę poznania mechanizmu aktywacji białka p53 przez aktynomycynę D i nutlinę-3a poprzez zbadanie roli kinazy syntazy glikogenu GSK3 w tym procesie.

Zasadnicza część rozprawy – *Wyniki* podzielona została na sześć podrozdziałów. W pierwszym z nich, opisano szczegółowo sposób analizy danych transkryptomicznych otrzymanych dla komórek A549 eksponowanych na działanie aktynomycyny D i nutliny-3a aktywujących p53. Dane te zostały uzyskane wcześniej przez dr Agnieszkę Gdowicz-Kłosok z zespołu prof. Marka Rusina. Analizę prowadzono wykorzystując szereg programów komputerowych i baz danych, korzystając także ze współpracy z ośrodkiem zagranicznym podczas dwumiesięcznego pobytu Doktorantki w *German Cancer Research Center* w Heidelbergu. Wyniki kompleksowo zilustrowano w rozprawie diagramami i wykresami Venna oraz mapą ciepła dla genów najsilniej aktywowanych przez aktynomycynę D i nutlinę-3a. Następnie, do dalszej analizy wybrano dwanaście genów, podzielonych na grupy funkcjonalne: *BLNK* i *MR1* – związane z odpowiedzią immunologiczną, *DRAXIN*, *FRMD8* i *FRZB* – związane ze szlakiem Wnt, *KANK3* i *CDH3* – związane z cytoszkieletem komórki, *RETSAT* – związany z metabolizmem, *CTSH* i *FBXO2* – związane z degradacją białek oraz *FAM13C* i *TMEM52* – geny o słabo poznanej funkcji, ale bardzo silnie aktywowane przez aktynomycynę D i nutlinę-3a. Dodatkowo, wyodrębniono sześć genów: *APOE*, *DDIT3*, *TYSND1*, *IL-7*, *IRF1* i *IFIT2*, które związane są z układem immunologicznym i neurologicznym. Wokół tych dwóch grup genów skoncentrowane były działania Doktorantki opisane w dalszych częściach rozprawy. Sądzę, że zarówno globalne wyniki analiz transkryptomicznych jak i zestaw genów wybranych do dalszych analiz uzasadnia niedawno zaproponowane w literaturze określenie genu *TP53* jako strażnika homeostazy. W kolejnym, krótkim podrozdziale, na podstawie wyników otrzymanych metodami Western blot, cytometrii przepływowej oraz mikroskopii optycznej, Doktorantka wykazała, że w komórkach A549 traktowanych aktynomycyną D i nutliną-3a następuje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazach

G1 lub G2, a w komórkach traktowanych kamptotecyną, która wywołuje podobny efekt aktywacji p53, zatrzymanie cyklu zachodzi w fazie G1.

W kolejnym etapie badań, sprawdzono aktywację wybranych wcześniej 12 genów, analizując poziom ich mRNA metodą RT-PCR, w dwóch typach komórek A549 oraz innej linii płucnych komórek nowotworowych NCI-H460, traktowanych aktynomycyną D i nutliną-3a, lub dla porównania, kamptotecyną. Każdorazowo, w analizie wykorzystano komórki z prawidłową ekspresją genu *TP53* oraz z ekspresją obniżoną techniką CRISPR/Cas9 lub shRNA. Należy przy tym podkreślić duży nakład pracy włożony przez Doktorantkę w realizację tego etapu badań oraz w opracowanie otrzymanych wyników pod względem istotności statystycznej. Podobną analizę przeprowadzono dla kolejnych sześciu wybranych genów związanych z immunologiczną odpowiedzią wrodzoną lub procesami neurodegeneracyjnymi, wykorzystując w tym przypadku linię komórkową A549 z obniżoną ekspresją genu *TP53* za pomocą CRISPR/Cas9. Na tym etapie, potwierdzono aktywację w komórkach traktowanych aktynomycyną D i nutliną-3a większości genów wybranych wcześniej na podstawie danych RNA-seq.

W następnym podrozdziale rozprawy, mgr Barbara Łasut-Szyska opisała wyniki analiz proteomicznych, mających na celu identyfikację białek, których poziom wzrasta w wyniku traktowania komórek aktynomycyną D i nutliną-3a. Do tego celu wykorzystowała wysokoprzepustową metodę spektrometrii mas LC-MS/MS, a dla wybranych białek również analizę typu Western blot. Analiza danych wysokoprzepustowych przeprowadzona została bardzo szczegółowo, a zidentyfikowane białka sklasyfikowano pod względem funkcjonalnym, korzystając z odpowiedniego oprogramowania komputerowego i baz danych. Analiza proteomiczna nie pozwoliła jednak na zidentyfikowanie białek kodowanych przez połowę genów, które zostały wybrane wcześniej na podstawie analizy transkryptomu. Wśród prawdopodobnych przyczyn, Doktorantka wymienia różną czułość metod RNA-Seq i LC-MS/MS lub proces alternatywnego splicingu (strony 129 i 170). Czy, korzystając z posiadanych danych, można by ocenić udział regulacji ekspresji wybranych genów także na poziomie translacji, skutkujący różnym poziomem kodowanych białek? Jakie dodatkowe doświadczenia można by zaplanować, aby zweryfikować to przypuszczenie?

Dla wybranych dwunastu genów postanowiono sprawdzić obecność potencjalnych miejsc wiązania białka p53 w ich regionach promotorowych. Po analizie informacji dostępnych w bazach danych sklonowano potencjalne miejsca wiązania p53 do plazmidów z genem reporterowym lucyferazy. Plazmidy te wprowadzano do komórek jednocześnie z plazmidem produkującym białko p53. W testach lucyferazowych wykorzystano także dwa wektory ze sklonowanymi promotorami zawierającymi zmutowaną sekwencję nukleotydową potencjalnego miejsca wiązania p53, a także wektor produkujący zmutowane białko p53. Wyniki tej kompleksowej analizy wykazały, że dla ośmiu z dwunastu analizowanych genów (*CDH3*, *CTSH*, *FBXO2*, *FRMD8*, *MR1*, *RETSAT*, *APOE*, *TYSND1*), test lucyferazowy potwierdził obecność miejsca wiązania p53 w ich regionach promotorowych. Analizę tej części rozprawy utrudniają niektóre bardzo małe, słabo czytelne rysunki (panele z analizami RNA-seq i Chip-seq na rycinach nr 69 – 80).

W ostatnim podrozdziale tej części rozprawy Doktorantka opisała próby wyjaśnienia mechanizmu aktywacji ekspresji genu *TP53* indukowanej przez aktynomycynę D i nutlinę-3a. Skoncentrowała się na testowaniu hipotezy, że w aktywacji tej istotną rolę odgrywa fosforylacja białka p53 przez kinazę syntazy glikogenu-3 (GSK3). W badaniach wykorzystano małą cząsteczkowy związek CHIR-98014, który klasyfikowany jest jako swoisty inhibitor tej kinazy. Aby globalnie ocenić działanie inhibitora CHIR-98014 przeprowadzono analizę transkryptomu

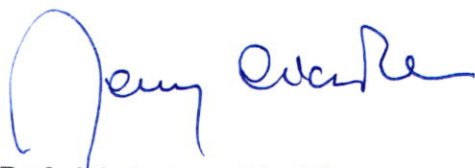
komórek traktowanych aktynomycyną D i nutliną-3a oraz tym inhibitorem. Wyodrębniono grupę genów, których ekspresja wzrastała jedynie pod wpływem aktynomycyny D i nutliny-3a, czyli blokowanych przez inhibitor oraz grupę genów, których ekspresja była dodatkowo podwyższona w obecności inhibitora. Dla wybranych genów, walidację uzyskanych wyników przeprowadzono metodą RT-PCR, potwierdzając dane RNA-seq. Dalsze, szeroko zakrojone badania mechanizmu działania inhibitora CHIR-98014 Doktorantka prowadziła z wykorzystaniem analiz typu Western blot, cytometrii przepływowej, kilku różnych linii komórkowych, komórek A549 z obniżoną ekspresją genu p53, a także inhibitora w kombinacji z niektórymi chemioterapeutykami. Ponadto, analizowano ekspresję wybranych genów, aktywowanych aktynomycyną D i nutliną-3a, również przy wyciszeniu genu kinazy GSK3, a także w obecności chlorku litu, jako innego inhibitora kinazy GSK3. W końcowym etapie, wybrano kilka związków, znanych jako inhibitory kinaz i przetestowano ich wpływ na aktywację p53 indukowaną aktynomycyną D i nutliną-3a. Wysunięte przez Doktorantkę wnioski dotyczyły zarówno mechanizmu aktywacji ekspresji genu p53 indukowanej przez aktynomycynę D i nutlinę-3a, jak również celowości wykorzystania inhibitora CHIR w kombinacji z chemioterapeutykami w celu stymulowania procesu apoptozy. Na szczególne podkreślenie zasługują wysokie umiejętności eksperymentalne Doktorantki udokumentowane w tym podrozdziale – np. jakość obrazów z analiz typu Western blot jest godna najwyższego uznania.

W rozdziale *Dyskusja* mgr Barbara Łasut-Szyska podsumowała najważniejsze osiągnięcia rozprawy i przedstawiła je na tle dostępnych informacji literaturowych. Wykazała, że na podstawie wyników wysokoprzepustowej analizy RNA-seq można zidentyfikować szereg genów zależnych od białka p53, indukowanego aktynomycyną D i nutliną-3a. Na drodze konsekwentnie prowadzonej weryfikacji, również z wykorzystaniem wysokoprzepustowej analizy proteomicznej, potwierdziła słuszność wyboru większości z tych genów. Podkreślenia wymaga bardzo kompetentne wykorzystanie przez Doktorantkę, z krytyczną analizą wyników, danych pochodzących z metod wysokoprzepustowych. Część ze zidentyfikowanych genów, jako podlegających regulacji przez p53 potwierdziły także opublikowane wcześniej wyniki innych badaczy. Nowatorstwo podejścia zastosowanego przez Doktorantkę polega przy tym na rodzaju użytych komórek A549 oraz sposobu indukcji p53 z wykorzystaniem synergistycznego działania aktynomycyny D i nutliny-3a. Na podstawie dostępnych danych literaturowych Doktorantka opisała proponowaną rolę funkcjonalną każdego z wybranych genów. Na drodze poszukiwania mechanizmu działania aktynomycyny D i nutliny-3a w aktywacji ekspresji genu *TP53* wykorzystwała również technikę analizy wysokoprzepustowej RNA-seq, a otrzymane przez nią dane stanowią dobry punkt wyjścia do dalszych badań w tym kierunku. Chociaż próby powiązania mechanizmu działania aktynomycyny D i nutliny-3a z fosforylacją p53 przy udziale kinazy GSK3 nie zakończyły się powodzeniem, to informacje uzyskane na temat działania inhibitorów kinaz mają istotne znaczenie, również dla badań bio-medycznych. Na podstawie uzyskanych wyników, Doktorantka zaproponowała nowy, alternatywny model działania inhibitora CHIR-98014 na szlaku aktywacji p53 za pomocą aktynomycyny D i nutliny-3a.

Reasumując, problematyka badawcza podjęta przez mgr Barbarę Łasut-Szyska jest bardzo ważna, a otrzymane wyniki stanowią znaczący wkład dla poznania znaczenia genu *TP53* jako supresora procesu nowotworowego. Część wyników została już opublikowana w czterech artykułach, w czasopiśmie: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *Neuroscience Letters*, *Cellular Signalling* oraz w *International Journal of Molecular Sciences* w 2021 roku, którego to artykułu Doktorantka jest pierwszym autorem. Znaczna część badań zrealizowana była w ramach kierowanego przez nią projektu NCN PRELUDIUM. Rozprawa doktorska przygotowana została w

sposób bardzo przejrzysty, co przy dużym zakresie zrealizowanych prac, w wykorzystaniu szerokiego spektrum nowoczesnych metod i technik badawczych, zasługuje na szczególne podkreślenie. Wyniki zostały wnikliwie przedyskutowane, w sposób świadczący o szerokim zorientowaniu Autorki rozprawy w uprawianej dziedzinie. Biorąc powyższe pod uwagę, sądzę, że rozprawa doktorska mgr Barbary Łasut-Szyska zasługuje na wyróżnienie.

Rozprawę doktorską mgr Barbary Łasut-Szyska oceniam bardzo wysoko i wnoszę do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnoszę o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.



Prof. dr hab. Jerzy Ciesiolka