

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Barbary Łasut-Szyszki pt. „Identyfikacja nowych genów regulowanych przez przeciwnowotworowe białko p53”.

Rozprawa doktorska mgr Barbary Łasut-Szyszki omawia istotne z biologicznego i terapeutycznego – punktu widzenia zagadnienia, dotyczące wpływu aktywowanego białka p53 na poziom ekspresji genów zależnych i niezależnych od p53 zaangażowanych w odmienne mechanizmy i szlaki sygnałowe, w tym również w apoptozę komórek nowotworowych. Biorąc pod uwagę wciąż mocno ograniczone metody terapeutyczne, jak i wyniki leczenia wielu nowotworów, każdy krok prowadzący do zdefiniowania nowych mechanizmów, w tym również zależnych od białka p53, indukujących zwiększoną wrażliwość komórek nowotworowych na terapię jest w pełni uzasadniony.

Praca doktorska zawiera 194 strony podzielone na konwencjonalnie przyjęte rozdziały, które ilustrują 102 ryciny i 14 tabel. 260 pozycji właściwie dobranego i cytowanego piśmiennictwa, umożliwia konfrontację wyników badań Doktorantki z wynikami innych autorów oraz podjęcie merytorycznej dyskusji. Warto nadmienić, że znaczna część cytowanego piśmiennictwa, to prace opublikowane w czasopismach o wysokim współczynniku wpływu (IF). Wstęp pracy doktorskiej rozpoczyna zwarty opis cech charakterystycznych dla komórek nowotworowych, które mają wpływ na ich biologiczne zachowanie. Znaczna część wstępu pracy dotyczy przeglądu aktualnego stanu wiedzy na temat roli białka p53, jako czynnika transkrypcyjnego wielu genów, jego modyfikacji potranslacyjnej, mechanizmów zależnych od statusu genu *TP53* oraz możliwości aktywacji p53 z uwzględnieniem aktynomycyny D i nutliny-3a. Z dużym znanstwem Autorka omawia zmiany struktury przestrzennej białka p53, modyfikacje potranslacyjne p53 oraz jego udział w regulacji cyklu komórkowego. Należy podkreślić, że omawiając regulatorową funkcję białka p53, związaną z różnymi procesami zachodzącymi w komórce, podkreśla znaczenie mutacji genu *TP53* w odniesieniu do funkcji tego białka. Ponadto, dużo uwagi poświęca opisom ścieżek sygnałowych, związanych z białkiem p53 podkreślając, że są one zależne od czynników indukujących stres w komórce, do których można zaliczyć czynniki biologiczne, chemiczne i fizyczne. Ostatnią częścią wstępu dysertacji są rozważania na temat technik, prowadzących do identyfikacji nowych genów regulowanych przez białko p53. Zdaniem Doktorantki, oprócz intensywnych badań zmierzających do zidentyfikowania kluczowych genów docelowych p53, trwają również prace

nad poszukiwaniem nowych genów regulowanych przez p53 oraz określeniem ich funkcji biologicznych.

Warto zaznaczyć, że Doktorantka we wnikliwy i przekonujący sposób uzasadnia celowość podjętych badań, będących podstawą Jej pracy doktorskiej. Podkreśla znaczenie zaproponowanego modelu badawczego, który nie tylko umożliwi identyfikację nowych genów zależnych i niezależnych od aktywacji białka p53, ale może dostarczyć nowych danych istotnych do pełniejszej charakterystyki indukowanych mechanizmów. Głównym celem pracy doktorskiej była identyfikacja nowych genów regulowanych przez białko p53 oraz poznanie funkcjonowania szlaków sygnałowych zależnych od p53 po traktowaniu linii komórek nowotworowych aktynomycyną D i nutliną-3a. Do realizacji celu głównego, Autorka sformułowała 8 celów szczegółowych, które zostały w pełni zrealizowane. Problem badawczy, który Autorka zamierzała rozwiązać wpisuje się w nowoczesny nurt badań, dotyczący określenia zmian zachodzących na poziomie molekularnym w komórce nowotworowej w odpowiedzi na stres indukowany działaniem związków chemicznych. Należy z uznaniem stwierdzić, że realizacja postawionych celów badawczych wymagała, nie tylko przygotowania merytorycznego oraz dobrego opanowania metod badawczych, ale również ogromnego nakładu pracy i czasu.

Opis części metodycznej pracy jest na tyle obszerny, że pozwala na dokładną analizę przyjętej metodologii, oraz zastosowanych metod i technik badawczych. Do realizacji nakreślonych zadań, Doktorantka posłużyła się sześcioma ludzkimi nowotworowymi liniami komórkowymi, z których większość były to linie komórkowe raka płuc oraz linia prawidłowych ludzkich fibroblastów. Metodologia badań została dobrze zobrazowana na rycinie 14. Usystematyzowanie etapów badań, zastosowanych metod i technik, nie tylko obrazuje chronologię prowadzonych eksperymentów, ale utwierdza w przekonaniu, że Doktorantka posiada doświadczenie i przygotowanie merytoryczne w planowaniu eksperymentów badawczych. Zastosowane metody badawcze nie budzą zastrzeżeń merytorycznych, większość można zaliczyć do nowoczesnych technik stosowanych w ukierunkowanych badaniach z zakresu biologii medycznej czy biotechnologii. Dobór modeli eksperymentalnych, metod badawczych oraz wachlarz wykonanych analiz, umożliwił Autorce uzyskanie wyników, które potwierdziły lub wykluczyły postawione hipotezy, jak również stanowiły podstawę do formułowania nowych hipotez do dalszych badań. Praca jest dobrze opracowana statystycznie z odpowiednio dobranymi testami obliczeniowymi.

Wyniki badań to obszerny rozdział pracy doktorskiej, który Autorka rozpoczyna od zobrazowania spektrum białek, będących wynikiem działania aktynomycyny D, nutliny-3a oraz

kamptotecyny na komórki nowotworowe linii różnego pochodzenia. Stwierdza, że zastosowane substancje prowadzą do fosforylacji białka p53, jednak proces ten jest najsilniej stymulowany przez łączne zastosowanie aktynomycyny D i nutliny-3a. Opierając się na dostępnych bazach danych, określających miejsce wiązania p53, w obrębie chromatyny (dane CHIP-seq) oraz wynikach sekwencjonowania transkryptomu (RNA-seq) linii komórkowej raka płuc A549 eksponowanej na analizowane związki, Doktorantka wytypowała 12 genów (CTSH, DRAXIN, TMEM52, FRMD8, CDH3, RETSAT, FAM13C, FBXO2, KANK3, BLNK, MRI, FRZB) do szczegółowej analizy zależności od białka p53 oraz 6 genów (DDIT3, TYSND1, IL-7, APOE, IFIT2, IRF1) związanych głównie z mechanizmami odporności komórkowej, jako potencjalnych celów *TP53*, które są słabo poznane. Opierając się o bazę *genecards.com.*, Autorka podzieliła wybrane geny na grupy funkcjonalne. W wytypowanych grupach były geny związane z odpowiedzią immunologiczną, odpornością wrodzoną, szlakiem Wnt, cytoszkieletem komórki, metabolizmem, degradacją białek, patogenezą chorób neurodegeneracyjnych, ale także geny o słabo poznanej funkcji takie jak: FAM13C i TMEM52. Do zobrazowania zmian poziomu ekspresji genów zależnych od p53, Doktorantka wykorzystała komórki linii z wyindukowaną obniżoną ekspresją genu *TP53* przy użyciu systemu lentiwirusowego (shRNA) oraz metody CRISPR/Cas9, które poddano działaniu badanych związków. Zastosowany model oraz ocena ekspresji genów w czasie rzeczywistym (RT-PCR), umożliwiła wykazanie istotnego wpływu aktynomycyny D i nutliny-3a oraz kamptotecyny na ekspresję większości badanych genów zależnych od aktywacji białka p53. Zidentyfikowano również geny, których aktywność jest niezależna od p53 (IFIT2, DDIT3) oraz geny, których ekspresja jest częściowo zależna od p53 (IRF-1, APOE). Istotną obserwacją było stwierdzenie, że wysoki poziom aktywności genów może być wynikiem synergistycznego działania aktynomycyny D i nutliny-3a. Doktorantka zwraca uwagę, że poziom ekspresji niektórych genów zależał od modelu wyciszana *TP53*. Podniesie tej kwestii w pracy doktorskiej świadczy o obiektywnej analizie wyników badań i całościowym ich przedstawieniu, a nie o selektywnym wyborze. Uzupełnienie wyników oceny ekspresji genów o analizę proteomiczną lizatów komórek oraz pożywki po hodowli komórek linii A549 eksponowanych na badane związki dostarczyło wartościowych danych, umożliwiających pełniejsze zobrazowanie funkcji biologicznych genów poprzez ocenę ich produktów białkowych. Cenną obserwacją było zidentyfikowanie białek, obecnych w komórkach i medium hodowlanym oraz wykazanie większej grupy białek w medium, niż w lizatach komórkowych. W badanych próbkach stwierdzono obecność białek związanych z metabolizmem komórki, szlakiem sygnalizacyjnym p53, odpowiedzią immunologiczną komórki. Najważniejszym

wynikiem tej części badań było wykazanie spójności pomiędzy spektrum oraz poziomem ekspresji aktywowanych genów po ekspozycji na aktynomycynę D i nutlinę-3a, a syntezą ich produktów białkowych związanych ze szlakiem sygnalizacyjnym p53 w lizatach komórkowych i płynie hodowlanym. Wyniki badań jednoznacznie wskazują, że efekt działania aktynomycyny D i nutliny-3a oraz kamptotecyny na komórki prowadzi, nie tylko do nasilenia aktywności analizowanych genów, ale również do wzrostu uwalniania ich produktów białkowych poza komórkę, co potencjalnie może mieć wpływ na generowane mikrośrodowiska.

Regulacyjną funkcję białka p53 w odniesieniu do ekspresji docelowego genu, Doktorantka wykazała identyfikując miejsce wiązania p53 w promotorze analizowanego genu. Zastosowanie testów lucyferazowych dostarczyło wyników w oparciu, o które możliwe było wytypowanie sześciu z dwunastu analizowanych genów z potwierdzoną obecnością sekwencji wiązania p53. Uzyskane wyniki cechują, zarówno walory poznawcze, jak i możliwość implikacji klinicznych, ponieważ pośrednio określają potencjalne mechanizmy, które mogą być uruchamiane w komórce nowotworowej, jako wynik aktywacji p53. Cennych wyników o dużym potencjale aplikacyjnym dostarczyły badania, dotyczące określenia mechanizmu prowadzącego do pozytywnej regulacji p53 po ekspozycji na aktynomycynę D i nutlinę-3a. Autorka skupiła się na poszukiwaniu kinaz, odpowiedzialnych za fosforylację białka p53, jednocześnie stawiając hipotezę, że „fosforylacja białka p53 w odpowiedzi na aktynomycynę D i nutlinę-3a może być indukowana przez jedną z izoform kinazy syntazy glikogenu (GSK3A lub GSK3B)”. Wynikiem potwierdzającym postawioną hipotezę było stwierdzenie blokującego wpływu inhibitora kinazy syntazy glikogenu o nazwie CHIR- 98014 na modyfikację p53 oraz na aktywność niektórych grup genów zależnych od p53.

Kompleksowa ocena działania inhibitora CHIR w oparciu o wyniki sekwencjonowania transkryptomu komórek linii A549 eksponowanych na działanie aktynomycyny D i nutliny-3a oraz inhibitora CHIR, umożliwiła Autorce wytypowanie genów, których aktywność była silnie hamowana. W grupie tej były geny związane z odpornością wrodzoną oraz geny antyapoptotyczne. Inhibitor CHIR nie wpływał na ekspresję większości genów proapoptotycznych. Wyjątek stanowiły dwa geny GDF15 i BCL2L15, których ekspresja była nasiloną w wyniku działania CHIR w połączeniu z aktynomycyną D i nutliną-3a. Ciekawą obserwacją o istotnym potencjale praktycznym, było wykazanie indukcji apoptozy w komórkach nowotworowych linii A549 eksponowanych na działanie aktynomycyny D i nutliny -3a w połączeniu z CHIR. Przeprowadzając analizę wpływu inhibitora CHIR na aktywność genów stymulowanych przez p53, Autorka skoncentrowała się na ocenie ekspresji genów kodujących białka proapoptotyczne (BBC3, FAS, PMAIP1, GDF15, BCL2L15),

antyapoptotyczne (H19, CRYAB), hamujące progresję cyklu komórkowego (CDKN1A, CCNG2). Wykazano, że inhibitor CHIR, blokując aktywację genów antyapoptotycznych H19, CRYAB, jednocześnie nasila ekspresję genów proapoptotycznych GDF15 i BCL2L15, co prowadzi do apoptozy komórek nowotworowych, poprzez zmianę proporcji sygnałów na korzyść sygnałów proapoptotycznych. Zdolność indukcji apoptozy przez inhibitor CHIR została zweryfikowana w liniach komórkowych (NCI-H460 i NCI-H292) z prawidłową ekspresją p53 oraz w linii i(NCI-H299) z deficytem p53. Wyniki badań potwierdziły indukcję apoptozy przez CHIR w analizowanych liniach komórkowych, jednocześnie wskazując, że proces ten może być niezależny od białka p53. Uzyskany wynik może być cenną wskazówką przy ustalaniu leczenia onkologicznego, zwłaszcza, że inhibitor CHIR wzmacniał aktywność proapoptotyczną takich leków jak: kamptotecyna, etopozyd, paklitaksel, cis-platyna.

Interesujących wyników dostarczyły badania roli inhibitora CHIR w odniesieniu do grupy mało poznanych genów związanych z odpornością wrodzoną aktywowanych przez aktynomycynę D i nultinę-3a. Ważne było stwierdzenie, że CHIR blokuje ekspresję genów zależnych od p53, jak również genów niezależnych od p53 takich jak: IFIT1, IFIT3, IFIH1, a w proces ten mogą być zaangażowane dwa niezależne mechanizmy prowadzące do aktywności genów. Wyniki dotyczące wyciszenia ekspresji obu izoform kinazy syntazy glikogenu (GSK3A i GSK3) dostarczyły danych wskazujących na istnienie alternatywnego celu działania CHIR. Wykazano, że inhibitor CHIR-90014 nie działa selektywnie, hamując wyłącznie kinazę syntazy glikogenu, ale może działać na inne enzymy uczestniczące w aktywacji białka p53, a takim kandydatem może być cyklino-zależna kinaza 7 (CDK7).

Wielowątkowa i dobrze merytorycznie opracowana dyskusja oparta o najistotniejsze pozycje piśmiennictwa jest dobrze przedstawiona. Autorka umiejętnie interpretuje wyniki badań własnych w relacji z danymi innych autorów, podkreślając wartość uzyskanych wyników oraz poznawczy charakter prowadzonych badań. Sposób prowadzenia dyskusji, mnogość omawianych zagadnień dotyczących roli i funkcjonowania genów zależnych i niezależnych od p53 oraz mechanizmów indukowanych w wyniku stresu komórki nowotworowej omawia wnikliwie wskazując na ich znaczenie praktyczne. Autorka z dużą rozważą interpretuje wyniki badań własnych, podkreślając, że wyniki badań mogą zależeć zarówno od modelu eksperymentalnego, jak i sposobu aktywacji p53. W oparciu o wyniki pracy doktorskiej oraz opracowania innych badaczy przedstawia możliwości i kierunki dalszych badań.

Z przeprowadzonych badań i konfrontacji uzyskanych wyników z obserwacjami innych autorów, Doktorantka formułuje siedem wniosków końcowych. Są one z jednej strony

odpowiedzią na jasno sprecyzowane cele badawcze, z drugiej stanowią istotne wskazówki do podjęcia dalszych badań.

W uwagach krytycznych chciałabym zaznaczyć, że z reguły tytuły tabel nie zawierają informacji, dotyczących danych technicznych (Tabela 3,4,8,10,11). Nazwy niektórych genów są błędnie podane np. powinno być TYSND1, a jest TYDND1. Rycina 14 ilustruje schemat prowadzonych badań z podziałem na etapy oraz podaniem stosowanych metod. Należałoby oczekiwać kompatybilności z opisem zawartym w rozdziale „Metody Badawcze”. Legenda ryciny 19 jest zbyt obszerna. Część opisów można byłoby przenieść do tekstu wyników.

Podsumowanie. Zakres badań realizowany przez Kandydatkę w ramach pracy doktorskiej jest nowatorski, wyniki badań dostarczyły nowych i oryginalnych danych, które stanowią uzupełnienie istniejącego stanu wiedzy na temat mechanizmów regulacji genów zależnych i niezależnych od białka p53. Należy podkreślić, że wyniki dotyczące biologicznej funkcji mało poznanych genów powiązanych z p53 stanowią podstawę do dalszych badań. Wyniki Doktorantki mają znaczenie, nie tylko dla nauki, ale mogą przyszłościowo zostać wykorzystane w praktyce klinicznej, celem zwiększenia wrażliwości komórek nowotworowych na stosowane chemioterapeutyki.

Uważam, że praca doktorska mgr Barbary Łasut-Szyski jest bardzo wartościowym i nowatorskim opracowaniem, wnosi istotny wkład w poznanie procesów regulowanych przez białka p53 z uwzględnieniem aktywności genów zależnych i niezależnych od p53. Wysoki poziom naukowy, zastosowana metodologia badań oraz znakomite opanowanie warsztatu badawczego zasługuje na wyróżnienie pracy doktorskiej.

Praca doktorska mgr Barbary Łasut-Szyski spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz.595, z późn. zm). Na tej podstawie przedkładam wniosek do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. M. Skłodowskiej-Curie- Państwowego Instytutu Badawczego o dopuszczenie mgr Barbary Łasut-Szyski do dalszych etapów w przewodzie doktorskim oraz wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej.

Wrocław, 21.03.2022 r.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
Katedra Morfologii i Embriologii Człowieka
ZAKŁADU IMMUNOPATOLOGII
I BIOLOGII MOLEKULARNEJ
kierownik
prof. dr hab. Julia Bar