

dr hab. Małgorzata Kus-Liśkiewicz, prof. UR
Instytut Biotechnologii,
Uniwersytet Rzeszowski

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Gracjany Zając

pt. „Scharakteryzowanie odpowiedzi zależnej od czynnika transkrypcyjnego NF- κ B w komórkach z różnym statusem p53 poddanych działaniu promieniowania jonizującego”
wykonanej pod kierunkiem Prof. dr hab. Piotra Widłaka,
zrealizowanej 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

Podstawą formalną wykonania recenzji jest pismo pana Prof. dr hab. n. med. Zbigniewa Noweckiego, koordynatora ds. przewodów doktorskich Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie, Państwowego Instytutu Badawczego z dnia 6 czerwca 2023 roku, które informuje o powierzeniu mi obowiązków recenzentki wspomnianej wyżej rozprawy doktorskiej.

Przewód doktorski procedowany jest na podstawie ustawy z dnia 20 lipca marca 2018 r. o Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1668). Zgodnie z art. 187 ustawy, w niniejszej recenzji ocenione zostanie czy rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w dyscyplinie nauki medyczne i umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej oraz czy praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.

Rozprawa doktorska mgr Gracjany Zając przygotowana została według klasycznego opracowania monograficznego i posiada typowy układ z poszczególnymi częściami wyodrębnionymi jako rozdziały: Streszczenie i Abstract (w j. ang), Wykaz skrótów, Wstęp teoretyczny, Cel pracy (wraz z określoną hipotezą badawczą), Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja i Wnioski oraz Bibliografia (220 pozycji). Łącznie rozprawa doktorska liczy 91 stron i

zawiera 25 rycin oraz 3 tabele. Przedstawione wyniki badań powstały w trakcie realizacji grantu nr 2016/23/B/ST6/03455 pt. *Efektywne algorytmy symulacji modeli procesów stochastycznych w biologii obliczeniowej oraz metody syntezy modeli szlaków sygnałowych*, którego kierownikiem był dr hab. Krzysztof Puszyński. Projekt finansowany był przez Narodowe Centrum Nauki. W rozprawie zawarta została też informacja, wskazująca, że część z prezentowanych wyników jest przedmiotem publikacji, w której doktorantka jest pierwszym autorem:

- Activation of the atypical NF- κ B pathway induced by ionizing radiation is not affected by the p53 status; *Acta Biochim Pol*, 2022 Feb 7;69(1):205-210. doi: 10.18388/abp.2020_5942; G. Zając, M. Rusin, B. Łasut-Szyska, K. Puszyński, P. Widtak.

Ocena merytoryczna recenzowanej rozprawy doktorskiej

W rozprawie doktorskiej podjęto próbę scharakteryzowania odpowiedzi zależnej od czynnika transkrypcyjnego NF kappa B (NF- κ B) w komórkach poddanych działaniu promieniowania jonizującego. Ten jądrowy czynnik transkrypcyjny, odkryty w 1986 roku, ciągle wzbudza ogromne zainteresowanie wśród naukowców. Jego „wielowątkowe” oddziaływanie jest przedmiotem licznych prac badawczych. NF- κ B jest między innymi zaangażowany w wiele ważnych szlaków sygnalizacyjnych, jak na przykład synteza białek mających istotne znaczenie w procesach odpornościowych i zapalnych, a także w nowotworzeniu. Szczególnie ten ostatni proces i udział tego czynnika transkrypcyjnego jest ważny z punktu widzenia poznania biologii poszczególnych nowotworów i rozwoju nowych strategii terapeutycznych. Doktorantka, poprzez rozdział „Wstęp teoretyczny” umiejętnie wprowadziła Czytelnika w prezentowaną tematykę badawczą. Przedstawione są rodzaje promieniowania jonizującego i rozwinięty jest opis jego wpływu na komórki, co jest szczególnie ważne z racji użytej w dalszej części metodologii pracy. Cenne zagadnienie, które znalazło się w tej części pracy to określenie dawek promieniowania i jego wpływu na zdrowie. Doktorantka umiejętnie opisuje również zastosowanie radioterapii w leczeniu nowotworów, co w następstwie koreluje z podjętym tematem badawczym. W dalszej części dysertacji opisane zostały cel główny pracy oraz cele szczegółowe i sformułowano hipotezę badawczą.

W pracy analizie poddano różne modele komórkowe i oceniono zdolność aktywacji ścieżki NF- κ B pod wpływem promieniowania jonizującego, i jego różnych dawek. Dodatkowo, badania przeprowadzono równolegle na dwóch typach modeli komórkowych, tj. z aktywnym i nieaktywnym statusem białka p53. Białko to jest znane jako „strażnik genomu” i w komórce poddanej stresowi pełni funkcje ochronne poprzez min. aktywowanie systemów naprawy czy kierowanie na drogę apoptozy lub senescencji. Generalnie, białko p53 oraz NF- κ B mają przeciwne działanie w komórkach nowotworowych. Jednak wiadomo jest, że mogą współregulować indukcję genów prozapalnych. Z tego względu bardzo istotnym w pracy było podjęcie badań uwzględniając różny status białka p53. Wskazuje to na umiejętność Kandydatki w doborze modelu badawczego w odniesieniu do istniejących już badań. Pomimo, że znaleźć można liczne wyniki dotyczące ścieżki NF- κ B, to wprowadzenie dodatkowego wariantu analiz z aktywnym lub nieaktywnym białkiem p53, powoduje, że realizowany temat badawczy w pracy doktorskiej jest nowy i oryginalny.

Warto zauważyć, że znaczną część recenzowanej pracy doświadczalnej stanowią eksperymenty związane z doбором i optymalizacją układu badawczego. Często, w tego typu pracach obserwuje się odwzorowanie zastosowanego przez innych autorów modelu eksperymentalnego, choć nie zawsze jest to podejście właściwe. Na fakt ten, zwraca również uwagę Doktorantka. Podkreśla między innymi, że często pomijany jest wpływ różnych warunków prowadzenia eksperymentu na końcowe wyniki. Stąd też zasadnym jest przeprowadzenie optymalizacji badań celem wyboru najlepszego układu/wariantu prowadzenia badań. Takie podejście Kandydatki wskazuje na umiejętność samodzielnego prowadzenia i organizacji pracy naukowo-badawczej. Autorka przeprowadziła eksperymenty zmieniając warunki środowiska, w tym określiła (i) że zmiana pożywki w ustalonym czasie trwania badań jest kluczowa dla otrzymanych wyników, (ii) dobrała dawkę i czas napromieniowania. Dowodzi to zdolności do właściwego podejmowania decyzji i wyciągania wniosków z przeprowadzonych analiz. Walorem recenzowanej pracy jest fakt, że w trakcie opisywania uzyskanych wyników, Autorka rozprawy konfrontuje je z obecnie stosowanymi modelami terapeutycznymi. Dla przykładu, opis wyników testu klonogenności zależnej od dawek promieniowania, zestawiony został z aktualnymi „trendami” w radioterapii. Ten aspekt

może stanowić o potencjale praktycznego wykorzystania przeprowadzonych badań i ich dalszego wpływu na rozwój tej dyscypliny naukowej.

Uważam, że Autorka wybierając przewodni temat badawczy we właściwy sposób dokonała opisu istniejącego stanu wiedzy w tym zakresie, w poprawny sposób określiła cele pracy i sformułowała hipotezę badawczą. Do badań Kandydatka wykorzystwała różnorodne metody. Warto podkreślić, że określony typ analizy przeprowadzony był przy zastosowaniu często przynajmniej dwóch typów eksperymentów, co uwiarygodnia otrzymane wyniki. W dalszej części rozprawy Autorka umiejętnie interpretuje rezultaty na tle literatury. Dyskusja, choć dość krótka, przeprowadzona jest we właściwy sposób, stawiane są pytania, które wskazują na potrzebę przeprowadzenia dalszych badań. W ostatniej części Kandydatka przedstawia trzy wnioski końcowe stwierdzając, że hipoteza badawcza nie została potwierdzona.

Ocena metodologiczna recenzowanej rozprawy doktorskiej

Dysertacja została poprawnie skonstruowana, zawiera wszystkie wymagane elementy rozprawy doktorskiej. Od strony językowej recenzowana praca może zostać oceniona pozytywnie. Tylko w nielicznych przypadkach w rozprawie można znaleźć błędy (np. „*aby przekształcić w się*”), które nie wpływają na jakość merytoryczną pracy. W opisie wybranych metod i otrzymanych wyników Autorka często używa słowa „*medium*” (zaczepniętego z pewnością bezpośrednio z lektury piśmiennictwa w języku angielskim), które w mojej ocenie powinno zostać zastąpione po prostu słowem „*pożywka*”.

Zastosowana metodologia w pracy jest jak najbardziej właściwa. Doktorantka wykonała szereg zaawansowanych analiz, w tym transdukcję i prace z hodowlą linii komórkowych, metodę Western blot, analizę ekspresji genów qRT-PCT, wizualizację z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej czy technik immunocytochemicznych. Dowodzi to na posiadanie przez Doktorantkę bogatego warsztatu badawczego. Warto podkreślić, że wiele analiz zostało wykonanych równoległe z wykorzystaniem różnych technik eksperymentalnych. Dla przykładu, badanie dotyczące wpływu zmiany pożywki hodowlanej

określono na poziomie zmian ekspresji genów i jednocześnie identyfikacji z użyciem mikroskopii konfokalnej. W ten sposób otrzymane wyniki stają się dużo bardziej wiarygodne.

Wartym jest podkreślenia, że w części prezentującej otrzymane rezultaty, w niektórych rozdziałach (np. Rozdz. 3 i Rozdz. 5) znalazły się krótkie podsumowania opisujące wyniki pokazane na rycinach. Jest to bardzo pomocne dla Czytelnika i porządkuje otrzymane wyniki. Szkoda, że w końcowej części rozdziału VI WYNIKI nie znalazło się zbiorcze zestawienie zmian w profilu ekspresji badanych genów dla różnych ścieżek sygnałowych. Owszem, wszystkie analizy są w bardzo dobry sposób zaprezentowane graficznie, na licznych rycinach, jednak takie zestawienie ułatwiłoby ich porównanie i dalszą interpretację wyników.

Moja krytyczna uwaga dotyczy też przedstawienia na rycinach i w tekście wyników aktywacji ścieżki NF- κ B w komórkach z różnym statusem p53 (Ryc. 18-20). W tekście cytowane są nazwy „*ufosforylowana forma Ser536-P*”, podczas gdy na rycinie jest przedstawiony poziom białka „*P-p65*”, podobnie jest dla innych białek. Pomimo, że w legendzie rycin znalazło się ich wyjaśnienie i podwójne nazewnictwo, dla Czytelnika łatwiej byłoby interpretować opisany wynik w tekście jednocześnie śledząc poziom ekspresji białka pokazany na rycinie (przy użyciu tego samego rodzaju nazewnictwa).

Po zapoznaniu się z dysertacją, obok wskazanych wyżej niewielkich uchybień, miałabym kilka pytań do Doktorantki, i jeśli jest to możliwe, prosiłabym o odpowiedź podczas publicznej obrony:

- Na początku dysertacji Autorka zamieściła wykaz skrótów, który jest absolutnie konieczny w tego typu opracowaniach. Prawdopodobnie przypadkowo, zabrakło wyjaśnienia skrótu „TAD”, str. 8. Proszę o jego rozwinięcie.
- W trakcie opisu ścieżek sygnałowych NF- κ B w rozdziale 2 „Wstępu teoretycznego” wymieniono możliwe trzy rodzaje tych szlaków, jednak opis szczegółowy zawarto tylko dla ścieżki klasycznej oraz atypowej. Rozdział ten byłby opisany w pełni gdyby, choćby w kilku słowach, znalazła się charakterystyka trzeciej wskazanej ścieżki: atypowej. Proszę o wyjaśnienie dlaczego w tej części pracy pominięto ten opis, i proszę o jego krótką charakterystykę.

- Proszę Doktorantkę o wyjaśnienie czym kierowała się dobierając konkretne linie komórkowe do przeprowadzonych analiz.
- W rozdziale prezentującym wyniki analiz dotyczących ustalenia optymalnej dawki promieniowania, użyto stwierdzenia: „*W komórkach traktowanych TNF α nie zaobserwowano obecności żadnego z powyższych białek, co wskazuje na ich specyficzność...*” Proszę Doktorantkę o rozwinięcie tej myśli.
- W badaniu wpływu zmiany pożywki hodowlanej na aktywację ścieżki NF- κ B oszacowano zmianę w poziomie ekspresji trzech genów: *CXCL8*, *BIRC3*, *TNFAIP3*. Nie znalazłam w tekście pracy informacji dotyczącej doboru tych genów? Czy wyboru dokonano ze względu na ich potwierdzoną indukcję pod wpływem obu rodzajów stymulacji (tj. czynnika prozapalnego jak i promieniowania jonizującego)? Jeśli tak to czy były badane równolegle geny o statusie aktywacji tylko w przypadku pojedynczego czynnika?

Podsumowując, chciałabym podkreślić, że recenzowana przez mnie praca dowodzi posiadania przez Doktorantkę wiedzy teoretycznej w dyscyplinie nauki medyczne, o czym świadczy obszerne zaprezentowanie stanu wiedzy na temat realizowanych badań i w następstwie, dobrze przeprowadzona dyskusja otrzymanych wyników. Biorąc pod uwagę rodzaj i ilość wykonanych eksperymentów w celu zweryfikowania postawionej hipotezy badawczej, stwierdzam, że Doktorantka posiada umiejętność samodzielnego planowania i prowadzenia badań. Z uwagi na przedstawiony stan wiedzy, należy stwierdzić, że zaproponowana tematyka będąca podstawą dysertacji, stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Co więcej, wyniki uzyskane przez mgr Gracjanę Zając są bardzo wartościowe dla rozwoju dyscypliny i mogą w przyszłości być przedmiotem zainteresowania dla planowania nowych strategii terapeutycznych. Stąd mogą znaleźć zastosowanie w sferze gospodarczej. Warto podkreślić, że dowodem na posiadanie umiejętności prowadzenia badań i interpretacji otrzymanych wyników jest opublikowanie przez Doktorantkę części przeprowadzonych badań w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, zawartym w wykazie Journal Citation Reports; tj. *Acta Biochimica Polonica* (2.349 IF, 70 pkt MEiN).

W związku z powyższym, ja, niżej podpisana stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Gracjany Zając spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i wnioskuję do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii o dopuszczenie mgr Gracjany Zając do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


dr hab. Małgorzata Kus-Liśkiewicz, prof. UR

Rzeszów, dn. 21.07.2023 r.

Uniwersytet Rzeszowski