

Kielce, 18 lipca 2023 r.

Prof. dr hab. Anna Lankoff
Zakład Biologii Medycznej
Instytut Biologii
Uniwersytet Jana Kochanowskiego
ul. Uniwersytecka 7
25-406 Kielce

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pani mgr Gracjany Zając

pt.: Scharakteryzowanie odpowiedzi zależnej od czynnika transkrypcyjnego NF- κ B w komórkach z różnym statusem p53 poddanych działaniu promieniowania jonizującego.

Recenzja została wykonana w odpowiedzi na pismo Koordynatora ds. przewodów doktorskich Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie, Państwowego Instytutu Badawczego, prof. dr hab. n. med. Zbigniewa Noweckiego, z dnia 6 czerwca 2023 roku (pismo nr RNK-000/243/23), na mocy której zostałam powołana na recenzenta rozprawy doktorskiej Pani mgr Gracjany Zając.

Przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Gracjany Zając została przygotowana w Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów im. Prof. Mieczysława Chorążego, Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie, Państwowego Instytutu Badawczego, Oddział w Gliwicach pod kierunkiem prof. dr hab. Piotra Widłaka.

Rozprawa doktorska stanowi zwarte opracowanie liczące 91 stron, zawierające 25 rycin i 3 tabele. Została ona przygotowana w języku polskim, a jej struktura jest standardowa i charakterystyczna dla rozpraw doktorskich. Opracowanie podzielono na rozdziały obejmujące streszczenie rozprawy w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów, wstęp teoretyczny, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski oraz wykaz piśmiennictwa. We wstępie Doktorantka umiejętnie wprowadziła czytelnika w tematykę badawczą, przedstawiając podstawowe informacje o promieniowaniu jonizującym, jego wpływie na komórki oraz rodzajach odpowiedzi komórkowej na promieniowanie, o charakterystyce ścieżek sygnałowych NF- κ B, roli NF- κ B w proliferacji komórek nowotworowych, a także o budowie i funkcji białka p53 oraz współzależności ścieżek sygnałowych p53 i NF- κ B.

Przedmiotem pracy było scharakteryzowanie odpowiedzi zależnej od czynnika transkrypcyjnego NF- κ B w komórkach poddanych działaniu promieniowania jonizującego oraz weryfikacja hipotezy, że obecność białka p53 wpływa na aktywację atypowej ścieżki NF- κ B. Autorka postawiła sobie cztery zasadnicze cele:

1. opracowanie i scharakteryzowanie komórkowego modelu doświadczalnego do analizy aktywacji przez promieniowanie jonizujące ścieżki NFκB: określenie dawek promieniowania i punktów czasowych,
2. scharakteryzowanie modeli komórkowych o różnym statusie p53 pod kątem odpowiedzi na promieniowanie jonizujące i zdolności aktywacji ścieżki NFκB,
3. scharakteryzowanie kinetyki aktywacji atypowej i klasycznej ścieżki NF-κB w komórkach z różnym statusem p53,
4. scharakteryzowanie ekspresji genów zależnych od NF-κB w komórkach z różnym statusem p53.

Materiał do badań stanowiły linie komórkowe raka okrężnicy HCT116 i RKO oraz linia kostniakomięsaka U2-OS w dwóch wariantach: p53+ i p53-. Doktorantka posłużyła się wieloma metodami badawczymi, które zostały dobrane w sposób adekwatny do postawionych celów badań: metody Western blot, ilościowego PCR w czasie rzeczywistym, testu klonogenego, transdukcji w celu wyprowadzenia stabilnej linii U2-OS p65-EGFP i p65-dsRed oraz metod mikroskopowych i immunocytochemicznych.

Punktem wyjścia do badań była optymalizacja układu doświadczalnego, służącego do analizy aktywacji ścieżki NFκB w napromienianych komórkach. Optymalizacja układu doświadczalnego obejmowała zbadanie wpływu zmiany pożywki hodowlanej, różnych dawek promieniowania, różnych punktów czasowych, zależności dawka-czas oraz wpływu TNFα na aktywację ścieżki NF-κB na poziomie ekspresji wybranych genów oraz białek regulowanych przez tę ścieżkę, kinetyki aktywacji wybranych białek, specyficznych dla szlaku NF-κB oraz na poziomie komórkowym poprzez mikroskopową analizę translokacji białka p65 do jądra komórki. Przeprowadzenie szeregu eksperymentów przez Doktorantkę pozwoliło na wybór optymalnej dawki promieniowania oraz optymalnych punktów czasowych dla dalszych eksperymentów, mających na celu analizę wpływu statusu białka p53 na aktywację ścieżki atypowej NF-κB w napromienianych komórkach.

Kolejnym krokiem, podjętym przez Doktorantkę, było scharakteryzowanie wybranych modeli badawczych. W tym celu Doktorantka zastosowała metodę Western blot, której wyniki potwierdziły status białka p53 w wariantach „p53+” i „p53-” analizowanych linii komórkowych. Doktorantka zastosowała następnie test klonogeny do zbadania potencjału klonogenego we wszystkich badanych liniach komórkowych. Uzyskane wyniki potwierdziły założenie, że komórki o wariacie „p53-” wykazują wyższą przeżywalność i zdolność do tworzenia kolonii, a tym samym mniejszą wrażliwość na promieniowanie jonizujące, w porównaniu do komórek o wariacie „p53+”. Ponadto, Doktorantka wykazała, że skuteczność promieniowania w wyższych dawkach była zależna od typu nowotworu, z którego wywodziła się badana linia komórkowa. Spośród badanych linii komórkowych najbardziej wrażliwą na działanie promieniowania jonizującego okazała się linia U2-OS, w porównaniu do linii RKO i HCT116. Obserwacje Doktorantki potwierdzają aktualne trendy w radioterapii, która tylko w wybranych przypadkach jest wybierana jako pomocnicza metoda leczenia raka okrężnicy, z którego wywodzą się linie RKO i HCT116.

Komórki linii RKO, HCT116 oraz U2-OS z różnym statusem p53 zostały również poddane analizie Western blot w celu zbadania popromiennego poziomu fosforylacji białek ATM (Ser-1981), Chk2 (Thr-68) oraz p53 (Ser-15). Punktem odniesienia były wyniki uzyskane dla komórek inkubowanych z cytokiną TNF α . Zgodnie z oczekiwaniami Doktorantki, ekspozycja komórek na TNF α nie wywołała fosforylacji żadnego z badanych białek. Napromienienie komórek linii RKO, HCT116 oraz U2-OS o wariancie „p53-” nie wywołało fosforylacji białka p53, co również było spodziewanym efektem. Natomiast w komórkach o wariancie „p53+” fosforylacja białka p53 nastąpiła w różnym czasie i była zależna od linii komórkowej. Fosforylacja kinazy ATM oraz kinazy CHK2 nastąpiła we wszystkich badanych liniach komórkowych, bez względu na status białka p53. Zaobserwowano jednak drobne różnice pomiędzy liniami pod względem czasu, jaki potrzebny był do osiągnięcia maksymalnej fosforylacji.

Scharakteryzowane przez Doktorantkę warianty komórek zostały następnie wykorzystane do analizy wpływu statusu białka p53 na aktywację kanonicznego szlaku NF- κ B, indukowanego przez TNF α , oraz atypowego szlaku NF- κ B, indukowanego dwuniciowymi pęknięciami DNA, wywołanymi działaniem wysokiej dawki promieniowania jonizującego. Miarą wpływu statusu białka p53 na aktywację dwóch szlaków NF- κ B była kinetyka regulowanej przez kinazę IKK fosforylacji reszt serynowych: Ser-32 w łańcuchu I κ B α , Ser-536 w podjednostce p65, Ser-85 w białku IKK- γ /NEMO oraz całkowitego białka I κ B α . Uzyskane przez Doktorantkę wyniki wykazały, że aktywacja atypowego szlaku NF- κ B w napromieniowanych komórkach badanych linii była słabsza i znacznie opóźniona, w porównaniu do aktywacji kanonicznego szlaku NF- κ B, indukowanego przez TNF α . Ponadto, status białka p53 nie miał wpływu na aktywację atypowego szlaku NF- κ B w napromieniowanych komórkach.

Doktorantka podjęła następnie próbę zbadania wpływu statusu białka p53 na aktywację ścieżki NF- κ B w komórkach U2-OS oraz RKO przy zastosowaniu mikroskopii przyżyciowej. W tym celu Doktorantka wyprowadziła z sukcesem stabilne linie U2-OS p53+ (z konstruktem p65-dsRed) oraz U2-OS p53- (z konstruktem p65-EGFP). W przypadku linii RKO, efektywność transdukcji była zbyt niska, aby można było wykorzystać otrzymane linie komórkowe do dalszych eksperymentów. Wyprowadzone linie komórkowe posłużyły Doktorantce do analizy translokacji białka RelA/p65 do jądra komórkowego pod wpływem napromienienia lub ekspozycji na TNF α . Uzyskane wyniki w ciekawy sposób uzupełniły wyniki Western blot, wykazując, że translokacja białka RelA/p65 do jądra komórkowego w napromienionych komórkach jest opóźniona, w porównaniu do translokacji tego białka w komórkach inkubowanych z TNF α . Co ciekawe, poziom ufosforylowanego białka p65 był wyższy w komórkach o wariancie „p53-”, w porównaniu do komórek o wariancie „p53+” (bez względu na czynnik indukujący).

Ostatnim, i według mnie najciekawszym etapem badań, prowadzonych przez Doktorantkę, była analiza ekspresji wybranych genów zależnych od NF- κ B w komórkach o różnym statusie białka p53, stymulowanych TNF α lub napromienionych wysoką dawką promieniowania jonizującego Gy. Wybrane geny obejmowały sześć klasycznych celów NF-

κ B (CXCL8, TNFAIP3, NFKBIA, NFKB2, BIRC3 i PLAU) oraz gen RRAD, który jest uznawany w literaturze za gen regulowany zarówno przez p53 jak i NF- κ B. Ciekawi mnie, dlaczego Doktorantka zdecydowała się na taki wybór genów. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki wykazały, że ekspresja badanych genów była wyższa w przypadku stymulacji komórek cytokiną TNF α , w porównaniu do ekspresji w komórkach napromienionych. Wyniki wykazały również że, status białka p53, zarówno w komórkach stymulowanych TNF α , jak i napromieniowanych, wpływa na ekspresję genów, które są celami NF- κ B. W przypadku linii HCT116 i RKO, ekspresja wszystkich badanych genów była istotnie wyższa w komórkach o wariacie „p53-”, w porównaniu do komórek o wariacie „p53+” (bez względu na czynnik indukujący). W przeciwieństwie do tych dwóch linii, w komórkach U2-OS ekspresja badanych genów była istotnie wyższa w komórkach o wariacie „p53+”, w porównaniu do komórek o wariacie „p53-”. Reasumując, uzyskane w pracy wyniki, które są bardzo interesujące, mam kilka pytań do Doktorantki: Jaka, zdaniem Doktorantki może być przyczyna różnicy pomiędzy odpowiedzią komórek HCT116 i RKO, a komórek U2-OS, uzasadniająca ich odmienna reakcję? Co było powodem wyboru linii komórkowych? Interesuje mnie również opinia Doktorantki na temat ewentualnego zastosowania uzyskanych wyników w praktyce klinicznej.

Podsumowanie

Podsumowując, w opinii recenzenta cele pracy zostały sprecyzowane jasno i konkretnie. Liczne i zróżnicowane metody badań zostały poprawnie dobrane. Wyniki pracy są spójne i poszerzają w istotny sposób wiedzę na temat odpowiedzi zależnej od czynnika transkrypcyjnego NF- κ B w komórkach z różnym statusem p53 poddanych działaniu promieniowania jonizującego. Dyskusja własnych wyników badań prowadzona jest w sposób dowodzący dobrej znajomości nie tylko piśmiennictwa, a także wiedzy ogólnej i dowodzi odwagi Doktorantki w formułowaniu własnych wniosków, a także zdolności logicznego i syntetycznego myślenia. W opinii recenzenta uzyskane wyniki noszą cechy odkryć naukowych. Tym niemniej, Doktorantka nie ustrzegła się nieścisłości i drobnych błędów. Między innymi, Autorka stwierdziła we wstępie, że 1 jednostka dawki pochłoniętej, czyli 1 Gy jest równy 1 dawce skutecznej, czyli 1 Sv. Takie stwierdzenie jest faktycznie odpowiednie dla promieniowania gamma lub beta, jednak dla promieniowania alfa już nie, ponieważ w tym wypadku 1 Gy równy jest 20 Sv. Na stronie 23 Doktorantka stwierdziła, że „Jak wspomniano w rozdziale 1.1.1.2, jedną z metod naprawy DNA jest UPR, który zachodzi w siateczce śródplazmatycznej”. Po pierwsze, w rozprawie nie ma podrozdziału 1.1.1.2. Po drugie, UPR zdecydowanie nie jest jedną z metod naprawy DNA. UPR (ang. unfolded protein response) jest odpowiedzią komórek na obecność nieprawidłowo sfałdowanych białek w komórce. W literaturze są doniesienia, wskazujące na to, że sensory UPR, takie jak IRE1 α , PERK i ATF6 α odgrywają rolę w odpowiedzi na stres genotoksyczny w komórkach poprzez interakcję z białkami biorącymi udział w naprawie DNA (np. ATM, ATR, p53, p21, Chk1 i Chk2), ale takiej interakcji nie można utożsamiać z metodą naprawy DNA. Na stronie 24 Doktorantka stwierdziła, że „Gen TP53, który koduje białko p53, składa się z 11 egzonów [146, 147], końcowych produktów wykorzystania promotorów (P1 i P2) oraz splicingu

intronu-2 i intronu-9". Gen nie może składać się ze splicingu, ponieważ slicing to proces składania genu, którego głównym zadaniem jest usunięcie intronów. Przypuszczam, że Doktorantka miała na myśli dwa egzony o alternatywnym splicingu zlokalizowane w intronie 9 (eksony 9 β i 9 γ). Podobnie, nie można powiedzieć, że gen składa się z „końcowych produktów wykorzystania promotorów (P1 i P2)”. Wystarczyłoby wymienić promotor główny (P1) oraz drugi promotor, (P2), który został zlokalizowany w intronie 1. Z obowiązku recenzenta zmuszona jestem jeszcze zwrócić uwagę na używanie pewnych terminów. Przykładowo, na stronie 13 Doktorantka stwierdziła, że system naprawy niepasujących par zasad (MMR) (który poprawnie nosi nazwę systemu naprawy błędnie sparowanych zasad) obecny jest w praktycznie każdej komórce do poprawy błędów powstałych podczas syntezy nici DNA, a nie wyłapanych wcześniej. Określenie „wyłapanych” powinno być raczej zastąpione określeniem „rozpoznanych”. Podobna uwaga dotyczy kolejnego określenia na stronie 14: „końce DSB mogą zostać zligowane przez ligazę”. Sugerowałabym zastąpienie słowa „zligowane”, słowem „połączone”. W rozdziale 4 części VI Materiały i metody znajduje się pojęcie „Dose-rate”, które powinno być zastąpione określeniem „moc dawki”. Mam również uwagę dotyczącą spisu treści, który nie odzwierciedla rozdziałów i podrozdziałów zawartych w pracy, co utrudnia powrót do informacji podczas lektury rozprawy, m.in. w spisie nie ma rozdziałów i podrozdziałów części VI Materiały i metody, które w tekście obejmują aż 13 podrozdziałów. W spisie treści brak jest również podrozdziału 2.4, dotyczącego roli NF- κ B w proliferacji komórek nowotworowych, który został umieszczony w tekście. Na stronie 32 znajduje się rozdział 3, który zatytułowany jest: „Wyprowadzenie stabilnej linii U2-OS p65-EGFP i p65-dsRed”, natomiast treść tego rozdziału dotyczy wyprowadzenia linii komórek RKO. W rozdziale 4 na stronie 33 znajduje się opis wykonania testu klonogenego. Doktorantka wskazuje w nim, że finalnie liczone uzyskane kolonie. Nie wspomina, w jaki sposób obliczała przeżywalność na podstawie liczby kolonii. Mam tu na myśli obliczenia wydajności klonowania, a następnie na ich podstawie obliczenia frakcji przeżywających komórek. I na koniec, mam uwagę dotyczącą opisów rycin, na których przedstawiono wyniki. Są one dosyć nieprecyzyjne. Podstawową zasadą przygotowania prac naukowych jest fakt, że tabele i rysunki powinny być absolutnie zrozumiałe po „wyjęciu” ich z tekstu. Moja uwaga odnosi się szczególnie do opisu złożonych rycin przedstawiających wyniki Western blot (ryc. 17-19). Nie znalazłam nigdzie informacji na temat liczby powtórzeń eksperymentów Western blot. Czy Doktorantka przeprowadziła jeden, czy kilka niezależnych eksperymentów? Czy na rycinach zostały przedstawione reprezentatywne wyniki analizy Western blot oraz wykresy przedstawiające gęstość optyczną, odpowiadającą konkretnym obrazom prążków, czy może średnie wyniki pomiarów densytometrycznych dla kilku prób? Jeżeli jest to jednostkowy wynik pomiarów densytometrycznych, to zastanawia mnie, czy można na ich podstawie formułować ostateczny wniosek, mówiący o tym, że w badanym modelu status białka p53 nie wpływa na aktywację ani kanonicznej, ani atypowej ścieżki NF- κ B. Natomiast, jeżeli są to wyniki średnie, to na wykresach brakuje zaznaczonych istotności wyników dla poszczególnych białek i punktów czasowych.

Konkluzja końcowa

Mimo wymienionych uwag krytycznych, pozytywne aspekty rozprawy przewyższają wady dysertacji i nie wpływają na moją pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej Pani mgr Gracjany Zajac. Oceniając całość recenzowanej rozprawy należy uznać, iż jest ona świadectwem ogromnej pracowitości Doktorantki. Zawartość merytoryczna rozprawy, która została częściowo opublikowana w recenzowanym czasopiśmie, świadczy o jej dojrzałości naukowej, doskonałym warsztacie badawczym i umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Na podstawie dokonanej pozytywnej oceny rozprawy doktorskiej, stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630) i wnioskuje do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie, Państwowego Instytutu Badawczego o dopuszczenie Pani mgr Gracjany Zajac do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Sana Laukoff