

Dr hab. n. med. Magdalena Skonieczna, Prof. PŚ
Politechnik Śląska
Wydział Automatyki, Elektroniki i Informatyki
Katedra Inżynierii i Biologii Systemów (Rau-1)
44-100 Gliwice
Tel. 32 237 11 68

Gliwice, 11.08.2023 r.

**Rada Naukowa
Narodowego Instytutu Onkologii
im. M. Skłodowskiej-Curie
Państwowego Instytutu Badawczego
ul. W.K. Roentgena 5
02-781 Warszawa**

Niniejsza recenzja została przygotowana na zlecenie Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. M. Skłodowskiej-Curie Państwowego Instytutu Badawczego (pismo RNK-000/234/23) z dnia 06.06.2023 roku.

Ocena rozprawy doktorskiej

Autor rozprawy: mgr Gracjana Zajac

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

Promotor rozprawy: Prof. dr hab. Piotr Widlak

Miejsce wykonania pracy: Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów im. Prof. Mieczysława Chorażego, Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie, Państwowego Instytutu Badawczego, Oddział w Gliwicach.

Dziedzina: nauki medyczne i nauki o zdrowiu

Dyscyplina: nauki medyczne

Sm

Przedstawione wyniki badań powstały w trakcie realizacji grantu nr 2016/23/B/ST6/03455, którego kierownikiem był dr hab. Krzysztof Puszyński pt. *Efektywne algorytmy symulacji modeli procesów stochastycznych w biologii obliczeniowej oraz metody syntezy modeli szlaków sygnałowych* finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki, Polska (NCN).

Niektóre z przedstawianych wyników niniejszej pracy doktorskiej zostały już opublikowane w publikacji: Zając G, Rusin M, Łasut-Szyszk B, Puszyński K, Widlak P. 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.

Pozostały dorobek naukowy Doktorantki (bez wpływu na opinię Recenzenta):

Publikacje

1. Zając G, Rusin M, Łasut-Szyszk B, Puszyński K, Widlak P, *Activation of the atypical NF- κ B pathway induced by ionizing radiation is not affected by the p53 status.* Acta Biochimica Polonica, 2022 Feb 7, doi: 10.18388/abp.2020_5942
2. Janus P, Szoltysek K, Zając G, Widlak W, Stokowy T, Wojtaś B, Widlak P, *The role of NF- κ B transcription factor in cellular response to ionizing radiation.* Biopolymers and Cell 2019 May 35 (3):183-183 [publikacja pokonferencyjna]
3. Janus P, Szoltysek K, Zając G, Stokowy T, Walaszczyk A, Widlak W, Wojtaś B, Gielniewski B, Iwanaszko M, Braun R, Cockell S, Perkins N.D., Kimmel M, Widlak P, *Pro-inflammatory cytokine and high doses of ionizing radiation have similar effects on the expression of NF-kappaB- dependent genes.* Cell Signal. 2018 Jun; 46:23-31.
4. Szoltysek K, Janus P, Zając G, Stokowy T, Walaszczyk A, Widlak W, Wojtaś B, Gielniewski B, Cockell S, Perkins N.D., Kimmel M, Widlak P, *RRAD, IL4II, CDKN1A, and SERPINE1 genes are potentially co-regulated by NF- κ B and p53 transcription factors in cells exposed to high doses of ionizing radiation.* BMC Genomics. 2018 Nov 12;19(1):813

Doniesienia zjazdowe

1. Smolarz M, Zając G, Nowacka-Chmielewska M, Dębiec M, Przybyła M, Małecki A, Toborek M, Sex-specific methamphetamine-induced neurotoxicity in the brains of female and male mice. The 14th Cerebral Vascular Biology, 18-22.06.2023, Uppsala, Materiały zjazdowe, P119. [prezentacja plakatu]
2. Jelonek K, Zając G, Smolarz M, Widlak P. Activation of the NF- κ B pathway as a hypothetical element of the "radiation-induced bystander effect" mediated by exosomes released by irradiated cells. Gliwickie Spotkania Naukowe, 18-19.11.2022, Gliwice. [prezentacja plakatu]

3. Sojka DR, Rusin M, Zając G, Klyszech K, Ścieglińska D. p53-depletion enhances colon cancer cells' resistance to manumycin A. Gliwickie Spotkania Naukowe, 19-20.11.2021, Gliwice. [prezentacja plakatu]
4. Zając G, Puszyński K, Widlak P. Ionizing radiation activates the atypical NF- κ B pathway in RKO cells derived from human colorectal cancer. 13th CEEPC, 23-25.09.2019, Ustron. Materiały zjazdowe, P-10. [prezentacja plakatu]
5. Zając G, Puszyński K, Widlak P. Ionizing radiation activates the atypical NF- κ B pathway in RKO cells derived from human colorectal cancer. 44th FEBS CONGRESS, 6-11.07.2019, Kraków, Materiały zjazdowe, 127. [prezentacja plakatu]
6. Zając G, Janus P, Puszyński K, Widlak P. Promieniowanie jonizujące aktywuje atypową ścieżkę NF- κ B w komórkach RKO pochodzących z ludzkiego raka jelita grubego. IV Spotkania z Onkologią Molekularną i Translacyjną, 4-5.04.2019, Warszawa, Materiały zjazdowe, 33. [prezentacja plakatu]
7. Zając G. Identyfikacja metodami genomiki integracyjnej nowych genów potencjalnie współregulowanych przez NF- κ B i p53. Śląskie Spotkania Naukowe, 2018, Bobolice. [prezentacja ustna]
8. Zając G, Grobys D, Karachitos A, Kmita H. Wpływ zmutowanej i natywnej wersji huntingtyny na parametry bioenergetyczne mitochondriów drożdży *Saccharomyces cerevisiae* z ekspresją ludzkich form białka VDAC. Spotkanie Młodych z Nauką, 23.03.2013, Poznań. [prezentacja ustna]

Syntetyczne przedstawienie pracy

Praca składa się z głównej części biologicznej (eksperymentalnej) oraz obliczeniowej (analiza otrzymanych wyników), dodatkowo poprzedzona jest obszernym wstępem teoretycznym, a zakończona dyskusją wyników z wnioskami. Jest przedstawiona w postaci monografii obejmującej 91 stron jednostronnego maszynopisu. W pracy zawarto 25 rycin, dotyczących zagadnień poruszanych we wstępie teoretycznym (Ryc. 1-6) oraz wyników uzyskanych w pracy (Ryc. 7-25), a także trzy tabele (Tab. 1 ze wstępu oraz Tab. 2 i 3 dotyczące przedstawianej metodyki). Warto zauważyć, że wszystkie ryciny powstały w opracowaniu własnym doktorantki, na podstawie danych literaturowych (wstęp pracy) oraz na podstawie uzyskanych wyników. Praca napisana jest w X rozdziałach, co obejmuje kolejno: streszczenie pracy (w języku polskim i w języku angielskim); wykaz niektórych skrótów używanych w pracy; wstęp teoretyczny; cel pracy; opis warunków eksperymentalnych (materiały i metody); wyniki i dyskusję. Pracę zamyka podsumowanie całości i bibliografia.

Ogólnym celem projektu doktorskiego było przeprowadzenie badań pozwalających na lepsze zrozumienie i scharakteryzowanie sposobu aktywacji ścieżek molekularnych zależnych od czynnika NF- κ B w napromieniowanych komórkach, w tym określenie zależności od dawki promieniowania oraz porównanie tego typu odpowiedzi z „klasyczną” ścieżką NF- κ B aktywowana przez czynniki prozapalne, a także określenie wpływu obecności białka p53 na aktywację atypowej ścieżki NF- κ B.

Opinia o poprawności i oryginalności postawionej tezy i w jakim stopniu została ona wykazana

W projekcie wykorzystany został model *in vitro* z zastosowaniem panelu linii komórkowych (m.in. komórki pochodzące z raka jelita grubego i kostniakomięsaka), w tym również linie z różnym statusem p53. Oceniona została kinetyka aktywacji ścieżki NF- κ B i jej zależność od dawki promieniowania na poziomie białka oraz ekspresji genów. Z przeprowadzonych badań wynika, iż obecność p53, zarówno w komórkach stymulowanych cytokinami, jak i napromieniowanych, wpływa na ekspresję genów, które są celami NF- κ B. Odzwierciedla to znaną interferencję między obydwoma czynnikami transkrypcyjnymi, ponieważ p53 bezpośrednio i pośrednio wpływa na ekspresję wielu genów zależnych od NF- κ B, natomiast nie ma wpływu na aktywację szlaku adresowanego na poziomie inhibitora I κ B α i efektora NF- κ B. W pracy postawiono hipotezę badawczą, czy obecność białka p53 wpływa na aktywację atypowej ścieżki NF- κ B? Zatem postawiona na początku pracy teza była oryginalna, została w części potwierdzona.

Opinia o analizie źródeł świadczącej o dostatecznej wiedzy autora w danej dyscyplinie naukowej

Wiedzę autorki oceniam jak bardzo dobrą: rozprawa obejmuje 220 pozycji literaturowych, w skład, których wchodzi prace dotyczące wszystkich poruszonych aspektów we wstępie teoretycznym (prace oryginalne sprzed 20-30 lat, a także opublikowane w ostatnich latach) – bogaty i prawidłowy dobór źródeł literaturowych historycznych i przedstawiających najnowsze doniesienia w poruszonym zakresie tematycznym – w najnowszych Autorka przedstawianej rozprawy doktorskiej jest współautorem (np. pozycje literaturowe nr 198 i 199 z roku 2018, a także najnowsza z roku 2022, gdzie p. Gracjana Zajac jest pierwszym autorem).

Opinia o pozycji rozprawy w stosunku do stanu wiedzy reprezentowanych przez literaturę światową

W świetle aktualnych zasobów literaturowych, wiele spośród doniesień szczegółowo opisuje „klasyczną” ścieżkę NF- κ B aktywowaną przez czynniki prozapalne, a także skupiających się na wpływie białka p53 na jej aktywację. Oryginalnym zatem podejściem jest aktywacja „atypowej” ścieżki NF- κ B w powiązaniu z obecnością funkcjonalnego białka p53 w wybranych liniach komórkowych nowotworów okrężnicy i kostniakomięsaka, dodatkowo po stymulacji cytokiną prozapalną i promieniowaniem jonizującym (IR). Zespół badawczy, w którym prace eksperymentalne wykonała doktorantka jest jednym z bardziej znanym w omawianym obszarze tematycznym, czego dowodzą wspomniane publikacje w renomowanych pismach zagranicznych i przyznane do tej pory granty badawcze.

Opinia o znaczeniu uzyskanych wyników dla danej dyscypliny naukowej

Przeprowadzone badania są oryginalne i Autorka uzyskała ciekawe wyniki. O ich wartości świadczą publikacje naukowe w dobrych czasopismach, a także zrealizowane granty, w których Autorka była wykonawcą.

Opinia o umiejętności autorki do poprawnego i przekonującego przedstawienia uzyskanych przez siebie wyników

Umiejętność tę oceniam wysoko. Z wyjątkiem nieznacznych uchybień edytorskich (znaki przystankowe, stylistyka, deklinacja, czasami styl i gramatyka zdania, itp.), które bywają nie do uniknięcia, zwłaszcza na końcowych etapach edytowania pracy – błędy te nie umniejszają wartości pracy i nie mają wpływu na jej wysoką i pozytywną ocenę merytoryczną. Autorka przekonująco opisała badania, zarówno te dotyczące części biologicznej, jak i przy analizie, czy interpretacji biologicznej uzyskanych wyników. Zdolność przekonującego opisu, czasami nieoczekiwanych z założeniami wyników, zwłaszcza przy próbie stworzenia uniwersalnego modelu doświadczalnego, składającego się z interdyscyplinarnych elementów pracy, zasługuje na podkreślenie.

Główne wady rozprawy

W dalszych częściach oceny rozprawy skupię się na części podsumowującej interpretację biologiczną wyników.

Za główną wadę rozprawy uważam brak całościowej, porównawczej analizy uzyskanych wyników biologicznych, tzn. podsumowania w formie tabeli, schematu itp., na podstawie, którego można by uzyskać np. tablicę decyzyjną podpowiadającą, którą ścieżką będzie przebiegała odpowiedź komórkowa. Mając do dyspozycji panel wyników eksperymentalnych, uzyskanych na podstawie badania profilu ekspresji genów i białek można było taki szlak odpowiedzi narysować w przyszłości, w przygotowaniu wyników np. do publikacji w piśmie proponuję taki schemat kompilacyjny przygotować.

W mojej opinii niedosyt wynika także z braku bardziej zaawansowanej oceny korelacji wyników z różnych punktów końcowych. Szczególnie brakuje próby analizy wieloparametrycznej, która pozwoliłaby na wykrycie występujących prawidłowości lub ich braku w ścieżkach odpowiedzi komórkowej. Możliwe, że w kolejnych etapach pracy naukowej Autorka podejmie się próby modelowania matematycznego (ewentualnie w ramach interdyscyplinarnej współpracy, takie badania są lub będą podjęte), które pomoże w obrazowaniu powiązań i zależności w szlakach komórkowych, a także w walidowaniu stawianych hipotez biologicznych.

Krytyczne uwagi szczegółowe

1. Autorka dołączyła do pracy wykaz niektórych skrótów używanych w pracy, jednak nie wszystkie są objaśnione, część jest podana wyłącznie w j. angielskim, pomimo tego, że posiada nazewnictwo polskie; objaśnienia nie są podawane w jednym i konsekwentnym stylu.
2. W metodyce, przy opisie testu klonogenego, zastosowanego do oceny przeżywalności linii komórkowych Autorka nie stosuje oceny parametrów typowych dla tego testu: wydajność posiewu (plating efficiency, PE); frakcja przeżywająca (survival fraction; SF) – dlaczego? Czy ilość wysiewanych na płytkę komórek była definiowana we wcześniejszych pracach? Co, np. z sytuacją, kiedy ilość wysiewanych na płytkę do testu komórek jest za mała lub za duża? Co z tempem proliferacji dla badanych linii komórkowych, zwłaszcza dla wyprowadzonych, między innymi metodą CRISPR/Cas nowych mutantów p53- – czy czasy inkubacji zostały prawidłowo dobrane? Autorka nie powołuje się przy ocenie wyników z testu klonogenego, ani wcześniej przy jego przygotowywaniu na protokoły literaturowe – pisze o koloniach klonogennych powyżej 30 komórek, podczas gdy w większości danych literaturowych, w oryginalnych pracach wskazania są na większe kolonie, tj. zliczenia dla kolonii powyżej 50 komórek [1, 2] – czy zatem w analizie wyników Autorka nie liczyła kolonii poronnych (możliwe, że mogłoby to mieć wpływ na uzyskane wyniki)?

- [1] Franken, N. A. P., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J. & van Bree, C. Clonogenic assay of cells in vitro. Nat. Protoc. 1, 2315–2319 (2006)
- [2] Puck, T. T. & Marcus, P. I. A Rapid Method for Viable Cell Titration and Clone Production with Hela Cells in Tissue Culture: The Use Of X-Irradiated Cells to Supply Conditioning Factors. Proc. Natl. Acad. Sci. 41, 432–437 (1955)

Wniosek końcowy

Osiągnięcia i oryginalne elementy publikacji, które powstały w toku realizacji pracy doktorskiej, a także jakość całego tekstu rozprawy, zaprezentowane wyniki badań eksperymentalnych i wyciągnięte wnioski są wystarczające do jej ogólnej pozytywnej oceny oraz spełniają zwyczajowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim.

Za najważniejsze osiągnięcia uznaję:

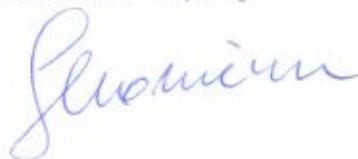
- opracowanie schematu eksperymentalnego dla atypowej ścieżki sygnałowej NF- κ B w komórkach z różnym statusem p53 poddanych działaniu promieniowania jonizującego;
- stwierdzenie, że w badanym modelu status p53 nie wpływa na aktywację ani kanonicznej, ani atypowej ścieżki NF- κ B;
- dokonanie oceny eksperymentalnej, że na poziomie ekspresji genów docelowych dla NF- κ B, pomimo zaobserwowania różnic pomiędzy wariantami p53+ i p53-, nie można ustalić jednego wzoru aktywacji w zależności od statusu p53;
- stwierdzenie, że model eksperymentalny do badania atypowej ścieżki NF- κ B powinien być każdorazowo dokładnie scharakteryzowany, zwłaszcza pod względem optymalnej dawki promieniowania oraz punktów czasowych, w których ten model będzie analizowany;
- dodatkowo, aktywność naukową udokumentowaną licznymi publikacjami i doniesieniami konferencyjnymi.

7
gaw-

Stwierdzam, zatem z pełnym przekonaniem, że opiniowana rozprawa Pani mgr Gracjany Zajac pt. „Scharakteryzowanie odpowiedzi zależnej od czynnika transkrypcyjnego NF- κ B w komórkach z różnym statusem p53 poddanych działaniu promieniowania jonizującego” zawiera samodzielne rozwiązanie ważnego i istotnego problemu naukowego, jednocześnie spełniając wszystkie wymagania przewidziane dla rozpraw doktorskich w aktualnie obowiązującej Ustawie o Tytule Naukowym i Stopniach Naukowych.

W związku z moją pozytywną opinią, stawiam wniosek do Wysokiej Rady Narodowego Instytutu Onkologii im. M. Skłodowskiej-Curie, Państwowego Instytutu Badawczego o dopuszczenie rozprawy doktorskiej mgr Gracjany Zajac do publicznej obrony.

Dr hab. n. med. Magdalena Skonieczna
prof. Politechniki Śląskiej



GLIWICE, 11.08.2023