



UNIwersYTET MEDYCZNY

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Będzińskiej pt. „Identyfikacja nowych genów regulowanych przez p53 w komórkach eksponowanych na aktynomycynę D i nutlinę-3a”.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Agnieszki Będzińskiej wykonana została pod kierunkiem Pana 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.

Rozprawa doktorska mgr inż. Agnieszki Będzińskiej omawia ważne i mało poznane aspekty związane z regulacją rolą białka p53 w odniesieniu do aktywacji genów i białek związanych z funkcjonowaniem układu odpornościowego. Ważnym obszarem badań wykonanych w ramach pracy doktorskiej było, nie tylko zdefiniowanie nowych genów regulowanych przez białko p53 w nowotworowych liniach komórkowych po ekspozycji na aktynomycynę D i nutlinę -3a, ale przede wszystkim określenie jego roli w mechanizmach stymulacji przeciwnowotworowego działania komórek immunologicznych, zarówno na poziomie molekularnym, jak i ekspresji specyficznych białek, co jest kluczowym zagadnieniem w świetle opracowywania nowych strategii terapeutycznych.

Takiego zadania podjęła się Doktorantka w pracy badawczej będącej podstawą rozprawy doktorskiej, której celem była ocena wpływu białka p53 na regulację wybranych genów, w tym genów odpowiedzialnych za uwrażliwienie komórek nowotworowych eksponowanych na aktynomycynę D i nutlinę-3a na cytotoksyczne działanie komórek układu odpornościowego.

Ocena formalna

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska jest monografią podzieloną na konwencjonalnie przyjęte rozdziały, które ilustruje 60 rycin, 15 tabel, 259 pozycji piśmiennictwa. Rozprawa doktorska zawiera: wykaz publikacji, w których opublikowano część wyników pracy doktorskiej, spis treści, streszczenia w języku polskim i angielskim, w których Doktorantka w sposób zwięzły i komunikatywny przedstawia główne cele i osiągnięcia swojej pracy doktorskiej. Wykaz najważniejszych stosowanych skrótów oraz obszerny wstęp, w którym Doktorantka przedstawiła dotychczasowy stan wiedzy nawiązujący do tematyki pracy doktorskiej na bazie, którego sformułowane zostały hipotezy i cele pracy. Opis materiału badawczego i stosownych metod i technik. Wyniki badań to rozdział bogato ilustrowany rycinami. Dyskusja zakończona jest podsumowaniem i 8 wnioskami. Rozprawę doktorską kończy spis piśmiennictwa. Od strony formalnej przedłożona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymogi stawiane tego typu pracom. Stanowi spójne dzieło zawierające wyniki badań eksperymentalnych Doktorantki, przedstawione w kontekście konkretnych celów badań oraz dotychczasowej wiedzy w obszarze badawczym.

Ocena merytoryczna

We wstępie pracy doktorskiej Doktorantka przedstawiła charakterystykę komórek nowotworowych, zwracając uwagę na ich specyficzne biologiczne zachowanie. Dużo uwagi poświęca charakterystyce białka p53 i jego aktywacji. Wstęp kończy omówienie udziału komórek układu immunologicznego w indukcji apoptozy komórek nowotworowych. Kandydatka wskazuje na możliwość stymulacji efektu cytotoksycznego komórek immunologicznych oraz indukcji apoptozy komórek nowotworowych poprzez wzrost ekspresji genów p53-zależnych zaangażowanych w cytotoksyczność komórek immunologicznych. Hipotezą badawczą, którą Doktorantka weryfikowała, było zdefiniowanie wpływu aktywowanego białka p53 na udział komórek układu odpornościowego w indukcji odpowiedzi przeciwnowotworowej, jako wynik aktywacji genów i białek p53-zależnych odpowiedzialnych za efekt cytotoksyczny komórek immunologicznych. Celem głównym rozprawy doktorskiej była identyfikacja wybranych genów, w tym genów kodujących białka układu odpornościowego regulowanych przez p53 w komórkach nowotworowych ekspozowanych na aktynomycynę D i nutlinę -3a. Kandydatka sformułowała 5 celów pośrednich, które miały dać odpowiedź na postawioną hipotezę i cel badawczy. Zarówno cele, jak i zakres badań zostały w rozprawie jasno sformułowane w odniesieniu do aktualnego stanu wiedzy.

Materiał do badań stanowiły ludzkie nowotworowe linie komórkowe o zróżnicowanym statusie genu *TP53*. W eksperymentach, Doktorantka wykorzystwała 17 ludzkich nowotworowych linii komórkowych oraz 3 linie komórek prawidłowych. Głównym modelem badawczym były ludzkie nowotworowe linie komórkowe niedrobnokomórkowego raka płuc, A549, NCI-H460 oraz linia kostniakomięsaka U-2 OS. Opis metodologii pracy jest bardzo szczegółowy, co pozwala ocenić spektrum zastosowanych metod i technik badawczych, którymi Doktorantka posłużyła się do realizacji poszczególnych etapów badań. Wybór technik i procedur badawczych wykorzystany w poszczególnych eksperymentach pracy doktorskiej nie budzi zastrzeżeń merytorycznych i wskazuje na wysoki poziom prowadzonych badań. Efektem końcowym części eksperymentalnej było uzyskanie wyników potwierdzających lub wykluczających regulacyjną rolę p53 w aktywacji wybranych do analizy 24 genów (tab.15) oraz określenie udziału p53 w efekcie cytotoksycznego działania komórek układu odpornościowego w hodowlach nowotworowych linii komórkowych eksponowanych na aktynomycynę D i nutlinę-3a oraz inne związki cytotoksyczne.

Uzyskane wyniki zostały starannie udokumentowane w formie tabel, rycin, wykresów, a ich znaczenie zostało potwierdzone stosowną analizą statystyczną. W oparciu o przeprowadzone eksperymenty, Doktorantka wykazała, że białko p53 ulega aktywacji w komórkach nowotworowych trzech linii (A459, U-2 OS, NCI-H460) o odmiennym statusie genu *TP53* eksponowanych na działanie aktynomycyny D, nutliny -3a i kamptotekanu, skutkiem tej aktywacji był zróżnicowany wzrost ekspresji większości genów ujętych w tabeli 15, w tym 17 genów związanych z układem odpornościowym. Do wykazania udziału p53 w aktywacji ocenianych genów, Doktorantka wybrała trzy geny biorące udział we wrodzonej odpowiedzi układu odpornościowego: SLAMF7, KLRG2, NCR3LG1. Interesujących danych dostarczyła analiza miejsca wiązania białka p53 w sekwencjach genów: SLAMF7, KLRG2, NCR3LG1 w linach komórkowych eksponowanych na działanie aktynomycyny D i nutliny-3a, Autorka jednoznacznie potwierdziła regulacyjną rolę białka p53 w aktywacji genów związanych z układem odpornościowym. Udokumentowała silny związek pomiędzy statusem genu *TP53*, aktywacją białka p53, a ekspresją genu SLAMF7 i NCR3LG1. Doktorantka do dalszej analizy wybrała gen SLAMF7, którego białko pełni ważną rolę w indukcji odpowiedzi komórek immunologicznych na obecność komórek nowotworowych. Ważną obserwacją wynikającą z badań dotyczących oceny poziomu białka SLAMF-7 w różnych liniach komórkowych o zróżnicowanym statusie genu *TP53* było stwierdzenie, że aktywacji białka p53 po ekspozycji komórek nowotworowych na aktynomycynę -D, nutlinę -3a i kamptotekan towarzyszy silny wzrost akumulacji białka SLAMF7. Oryginalnych wyników dostarczyła

również ocena wrażliwości komórek niedrobnokomórkowego raka płuc na cytotoksyczne działanie komórek NK w ko-hodowlach po wcześniejszej ekspozycji komórek nowotworowych na aktynomycynę D i nutlinę-3a z uwzględnieniem statusu genu *TP53*. Istotnym spostrzeżeniem Doktorantki było stwierdzenie, że p53 może uwrażliwiać komórki nowotworowe na cytotoksyczne działanie komórek NK i należy brać pod uwagę dwa mechanizmy aktywacji efektu cytotoksycznego komórek układu odpornościowego p53-zależny i p53-niezależny. Analizując rolę białka p53 w aktywacji odporności przeciwnowotworowej komórek immunologicznych, Doktorantka skupiła się na ocenie zależności pomiędzy białkiem p53, a SOCS1 negatywnym regulatorem szlaku sygnalizacyjnego aktywowanego przez interferony. Wykazała zróżnicowany wpływ białka p53 na ekspresję genów zależnych od interferonów za pośrednictwem regulacji białka SOCS1 w komórkach nowotworowych eksponowanych na działanie aktynomycyny-D i nutliny -3a.

Dalsze badania Doktorantki wykazały, zarówno pozytywny, jak i negatywny wpływ białka p53 na ekspresję analizowanych genów zależnych od INF-1 α po uprzednim traktowaniu komórek nowotworowych aktynomycyną i nutliną-3a lub INF-1 α oraz po zastosowaniu obu związków równocześnie. Autorka potwierdziła pozytywny wpływ ekspresji INF-1 α na ekspresję genu IFIT3 oraz negatywny wpływ na ekspresję genów IFI44 i IFITM3 po ekspozycji komórek nowotworowych na aktynomycynę-D, nutlinę-3a i IFN-1 α . Przeprowadzając analizę ekspresji genów uczestniczących w szlaku zależnym od INF- γ w komórkach nowotworowych traktowanych aktynomycyną D i nutliną-3a wykazała, że białko p53 i INF- γ współdziałają w aktywacji trzech genów takich jak: CASP1, IFIT1 i IFIT3 odpowiedzialnych za odpowiedź immunologiczną. Kliniczny wymiar prezentują wyniki Doktorantki wykazujące uwrażliwienie komórek nowotworowych na proapoptotyczne działanie liganda FAS po ekspozycji na aktynomycynę D, nutlinę -3a i INT- γ . Kandydatka sugeruje, że efekt ten może być wynikiem synergistycznego działania p53 i INF- γ zwiększającego wrażliwość komórek nowotworowych na apoptozę.

W dyskusji pracy doktorskiej Doktorantka, omawia własne wyniki badań w odniesieniu do wyników uzyskanych przez innych Autorów, wskazując, że liczba opracowań na temat wpływu białka p53 na regulację genów układu odpornościowego jest ograniczona, co podkreśla znaczenie podjętej w pracy doktorskiej tematyki badań. Autorka podkreśla znaczenie wyników pracy wykazujących udział białka p53 aktywowanego aktynomycyną –D i nutliną -3a w regulacji procesów związanych z odpowiedzią immunologiczną. Twierdzi, że wyniki są cennym uzupełnieniem dotychczasowego stanu wiedzy i są wskazówką do wnikliwej analizy mechanizmów uwrażliwienia komórek nowotworowych na cytotoksyczne

działanie komórek immunologicznych. Istotną częścią dyskusji jest wskazanie na praktyczny aspekt badań, które mogą przyczynić się do opracowania nowych strategii terapii, w tym terapii celowanych. Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowanych zostało 8 wniosków będących wypadkową przeprowadzonych badań eksperymentalnych, które stanowią wyczerpującą odpowiedź na postawione cele i zadania badawcze.

W uwagach krytycznych

Analiza wpływu medium kondycjonowanego pochodzącego z ko-hodowli komórek linii NK-92 i komórek linii nowotworowej na komórki nowotworowe byłaby bardziej obiektywna po określeniu stężenia interferonów np. metodą ELISA.

Oznaczenia dla wartości statystycznie istotnych różnic uzyskanych wyników, Doktorantka umieściła w opisie wyników. Bardziej czytelne byłoby umieszczenie ich w legendzie rycin.

We wniosku trzecim, przedstawiono szeroki opis wyników należałoby zdefiniować znaczenie białka SLAMF7.

Podsumowanie. Zakres badań realizowany przez mgr inż. Agnieszkę Będzińską w ramach pracy doktorskiej jest nowatorski, wyniki badań dostarczyły nowych i oryginalnych danych, które stanowią uzupełnienie istniejącego stanu wiedzy z zakresu biologii nowotworów. Wyniki Doktorantki mają znaczenie, nie tylko dla nauki, ale mogą przyszłościowo zostać wykorzystane w praktyce klinicznej celem zwiększenia możliwości terapeutycznych i opracowania bardziej skutecznych metod immunoterapii nowotworów. Uważam, że praca doktorska mgr inż. Agnieszki Będzińskiej jest wartościowym i oryginalnym opracowaniem, wnosi istotny wkład do opracowania koncepcji stymulacji odpowiedzi układu immunologicznego, u pacjenta z chorobą nowotworową i pomimo uwag krytycznych, które nie obniżają jej nowatorskich aspektów zasługuje na wyróżnienie.

Praca doktorska mgr inż. Agnieszki Będzińskiej spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2022 poz. 574 ze zm.). Na tej podstawie przedkładam wniosek do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. M. Skłodowskiej-Curie Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie o dopuszczenie mgr inż. Agnieszki Będzińskiej do dalszych etapów w przewodzie doktorskim i wyróżnienie pracy doktorskiej.

Wrocław, 29.08.2024 r.