

Recenzja

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

Recenzowana rozprawa doktorska jest efektem prac prowadzonych przez Panią mgr. inż. Agnieszkę Będzińską 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 pod kierunkiem prof. dr hab. Marka Rusina.

Tytuł recenzowanej rozprawy sugeruje, że praca dotyczyć będzie jedynie identyfikacji genów, których regulacja za pośrednictwem białka p53 po podaniu aktynomycyny D i nutliny-3a nie była do tej pory opisana. Podkreślić należy jednak już na wstępie, że tytuł ten ukazuje jedynie znacznie zawężony zakres prac prowadzonych przez Doktorantkę i opisanych w Jej rozprawie, a każdy kolejny rozdział stanowi logiczne poszerzenie zagadnień wynikających z poprzednio opisywanej tematyki, otwiera nowe horyzonty i ukazuje ogrom pracy i różnorodność podejść badawczych, jakie Doktorantka zastosowała w trakcie realizacji swojego doktoratu.

Na potrzeby wskazania w recenzji wymaganych ustawowo elementów rozpraw doktorskich stwierdzić można, że wskazanym w rozprawie doktorskiej podjętym problemem naukowym jest niedostateczna wiedza na temat mechanizmów regulacji odporności przeciwnowotworowej przez białko p53, a wymagany ustawowo oryginalnym rozwiązaniem tego problemu jest zastosowanie metod genomiki funkcjonalnej i biologii molekularnej, w tym także uwzględniających pracę na modyfikowanych liniach komórkowych, dla podjęcia próby odnalezienia relacji między aktywacją białka p53 i wpływu tej aktywacji na odpowiedź interferonową oraz aktywność przeciwnowotworową komórek NK.

Po odpowiedniej weryfikacji modeli komórkowych i układu badawczego, mających mieć zastosowanie w recenzowanej pracy, jednym z pierwszych zadań opisanych w rozprawie jest potwierdzenie udziału białka p53 w zmianach ekspresji genów wyłonionych z przeprowadzonego wcześniej w laboratorium prof. Marka Rusina eksperymentu transkryptomycznego, którego wyniki zostały opublikowane w 2024 roku na łamach czasopisma *Chemico-Biological Interactions*. Analiza ta, poszerzona o analizę sekwencji regulatorowych trzech wybranych genów, stanowi zaledwie niejako wstęp do dalszych, równie interesujących, dogłębnych analiz opisanych w kolejnych rozdziałach. W dalszej części rozprawy znajdujemy bowiem opis doświadczeń, mających na celu zgłębienie wpływu białka p53 na aktywację białka SLAMF7, znaczenia białka p53 w cytotoksyczności komórek NK-92 względem linii komórkowej niedrobnokomórkowego raka płuca, roli białka p53 w regulacji działania interferonów, czy w końcu wstępnej charakterystyki udziału aktywacji p53 w obserwację oznak indukcji procesu apoptotycznego po zadziałaniu interferonu gamma i liganda receptora FAS. Recenzowana rozprawa skrywa więc ogrom wyników, będących efektem zapewne ogromu pracy Doktorantki włożonej w jej realizację, oraz znakomitego prowadzenia samego doktoratu przez Promotora rozprawy.

Wyraźnego podkreślenia zasługuje fakt, że recenzowana rozprawa stanowi niezwykle rzetelny raport naukowy z wykonanych prac badawczych, w którym każdy etap znajduje uzasadnienie we wcześniejszych badaniach własnych lub danych literaturowych, a każde wykonane oznaczenie przynosi nowe ciekawe obserwacje, i właściwie w wielu przypadkach otwiera drzwi dla prowadzenia dalszych, wielotorowych prac badawczych. Zrozumiałe jest natomiast, że ze względu na ograniczoność zasobów nie wszystkie wątki mogą zostać w pracy laboratoryjnej pociągnięte dalej. Niemniej jednak opisany w rozprawie, dokonywany na bieżąco wybór wątków wydaje się być rozsądnie uzasadniony przez Doktorantkę.

Niezwykle istotną kwestią jest fakt, że w rozprawie doktorskiej opisane są w sposób bardzo rzetelny zarówno te obserwacje, które wpasowały się w stawiane przed rozpoczęciem eksperymentów hipotezy badawcze, jak i te, które okazały się odmienne od tzw. „oczekiwań”. Raportowanie obu rodzajów wyników, wraz ze stosownym komentarzem i próbą wyjaśnienia zarówno spójnych wyników, jak i tych rozbieżnych w znacznej mierze

stanowi o dojrzałości recenzowanej Rozprawy oraz samej Doktorantki. Warto zaznaczyć, że już w rozdziale zatytułowanym „Wyniki” odnajdziemy komentarze i drobne elementy interpretacji, lecz ich obecność w tej części pracy jest jak najbardziej cenna i pozwala na stosowną argumentację i korespondencję z wynikami zawartymi w sąsiadujących podrozdziałach tej części pracy. Główny ciężar dyskusji przejmuje natomiast rozdział zatytułowany „Dyskusja” właśnie, w którym to Autorka dokonuje rzetelnej, usadzonej w literaturze analizy uzyskanych wyników. Cennym elementem tej części pracy są grafiki, podsumowujące w sposób czytelny wyniki opisane szczegółowo w części doświadczalnej. Punkt 5 „Podsumowanie” oraz rozdział „Wnioski” trafnie i zwięźle wskazuje na główne osiągnięcia i obserwacje opisane w całej pracy.

Kolejnym elementem zasługującym na uwagę jest warsztat doświadczalny, opisany w rozprawie i stanowiący podstawę do uzyskiwania interpretowalnych danych. A warsztat ten jest imponujący, nie tylko zważywszy na ilość stosowanych metod, ale przede wszystkim na jakość uzyskiwanych za ich pomocą wyników (powtarzalność wyników RT-qPCR, czy schludność i czytelność membran z hybrydyzacji western blot). Dzięki dbałości o warsztat możliwe było uzyskanie wiarygodnych danych, stanowiących podstawę do wnioskowania. Zastosowanie licznych linii komórkowych pozwoliło natomiast na szerokie spojrzenie na problematykę indywidualności uzyskiwanych wyników i zależności odkrywanych mechanizmów od podłoża genetycznego materiału wyjściowego.

Przechodząc do zwyczajowych elementów recenzji, recenzowana rozprawa doktorska ma formę klasycznej pracy pisemnej sporządzonej na 160 numerowanych stronach. Składa się ona z 8 rozdziałów, wśród których najobszerniejsze to Wstęp teoretyczny (25 stron), Materiały i metody (27), Wyniki (50 stron) i Dyskusja (24 strony). W pracy dostrzeżono bardzo nieliczne błędy językowe, zwłaszcza w sytuacjach których automatyczna korekta może nie dostrzec (np. „białko IFIT3 uległa słabej aktywacji (...), str. 108). W opinii Recenzenta nie ma potrzeby skupiać się na ich dokładnym wskazywaniu, ponieważ zrozumiałe jest, że są one nieodzownym elementem tak obszernych prac pisemnych. Z innych drobnych potknięć: na stronie 86 prawdopodobnie omyłkowo znalazł się odnośnik do ryc. 21 zamiast ryc. 25, a stwierdzenie „wzrost białka IRF1” jest dość potocznym stwierdzeniem, które nie powinno znaleźć się w rozprawie doktorskiej.

Z nielicznych uwag i pytań, jakie chciałbym zawrzeć w samej recenzji wymienić należy:

- czy faktycznie w buforze lizującym do przygotowania próbek na elektroforezę akrylamidową nie znajdowały się inhibitory proteaz i fosfataz?
- czy stosowane linie komórkowe podlegały regularnym testom pod kątem obecności *Mycoplasma sp.*?
- czy w przypadku hybrydyzacji western blot zamieszczone w rozprawie wyniki doczekały się stosownych powtórzeń biologicznych?

Podsumowując uważam, że recenzowana rozprawa zawiera liczne elementy oryginalnego rozwiązania problemu naukowego i prezentuje szeroką wiedzę teoretyczną kandydatki. Stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim w art. 187 ust. 1-2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. Zm.) i wnoszę do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. M. Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego o dopuszczenie Pani mgr. inż. Agnieszki Będzińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie zważywszy na ogrom pracy i jakość uzyskanych wyników wnioskuję o wyróżnienie Rozprawy doktorskiej.