

Dr hab. Agata Świątkowska
Instytut Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

Poznań, 30.08.2024

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

Niniejszą recenzję wykonałam jako osoba powołana do funkcji recenzenta przez Radę Naukową Narodowego Instytutu Onkologii im. M. Skłodowskiej-Curie, Państwowego Instytutu Badawczego.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Agnieszki Będzińskiej została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Marka Rusina w Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów im. Prof. M. Chorażego, Narodowego Instytutu Onkologii im. M. Skłodowskiej-Curie, Państwowego Instytutu Badawczego, oddział w Gliwicach.

Tematyka pracy dotyczy identyfikacji genów, które są regulowane przez białko p53 w komórkach traktowanych aktynomycyną D i nutliną-3a. Wcześniejsze badania prowadzone przez grupę prof. Marka Rusina wykazały, że mieszanina tych związków prowadzi do aktywacji białka p53, które działa jako czynnik transkrypcyjny i w konsekwencji aktywuje lub obniża aktywność docelowych genów. Pomimo szeroko zakrojonych badań dotyczących funkcji białka p53 nadal wiele pytań pozostaje bez odpowiedzi. Biorąc pod uwagę poznaną już rolę tego białka, jaką jest regulacja odpowiedzi komórkowej na stres i utrzymanie homeostazy w komórce, dalsze badania w zrozumieniu funkcjonowania białka p53 i jego zaangażowania w sieci regulatorowe jest bardzo istotne. Zwłaszcza, że mutacja w genie *TP53* są obserwowane u ponad 50-60% pacjentów z różnymi rodzajami nowotworów. Poznanie kolejnych genów, które są regulowane przez białko p53 jest jednym z kroków umożliwiających poszerzenia naszej wiedzy o białku p53 i jego zaangażowaniu w regulację homeostazy i przeciwdziałaniu procesom rozwoju nowotworu. Takie wyzwanie zostało podjęte przez mgr inż. Agnieszkę Będzińską w ramach jej pracy doktorskiej.

Rozprawa doktorska ma klasyczny układ. Składa się ona z obszernego wstępu teoretycznego, celu badań, rozdziału poświęconego metodyce i materiałom, rozdziału przedstawiającego wyniki i ich analizę, dyskusji, krótkiego podsumowania oraz bibliografii wraz ze spisem rycin i tabeli.

Wstęp teoretyczny rozpoczyna się krótkim rysem historycznym dotyczącym badań nowotworów. Następnie pani mgr Inż. Agnieszka Będzińska dokładnie przedstawia charakterystykę komórek nowotworowych. Kolejne podrozdziały dotyczą białka p53. Doktorantka również rozpoczyna tą część wstępu teoretycznego od rysu historycznego dotyczącego badań nad białkiem p53, dodatkowo jest on zobrazowany osią czasu, która kończy się jednak na roku 2021. Szkoda, że nie zostały wspomniane tu ostatnie badania dokonane w kolejnych latach aż do 2024, w którym to roku obchodzimy 45 odkrycia białka p53. Oczywiście nie umniejsza to jakości tej części wstępu teoretycznego. Pani mgr Inż. Agnieszka Będzińska dokładnie opisuje dotychczas znane funkcje białka p53, jego regulację a także rodzaje mutacji w genie *TP53* w szczególności mutacje, które występują z dużą częstotliwością oraz ich konsekwencje dla prawidłowego działania białka p53. Doktorantka opisuje także model aktywacji p53 w obecności aktywnomycyny D i nutliny-3a. Warto podkreślić, że jest to istotny podrozdział biorąc pod uwagę, że układ oparty na aktywacji p53 w obecności aktywnomycyny D i nutliny-3a był szeroko wykorzystany w części badawczej. Kolejna część wstępu teoretycznego dotyczy roli układu immunologicznego w usuwaniu komórek nowotworowych. W kilku podrozdziałach doktorantka opisuje powstawanie i rolę komórek NK (ang. *natural killer cells*) oraz szlaki interferonowe. Wstęp teoretyczny napisany jest w sposób klarowny w oparciu o najnowszą literaturę. Każde zagadnienie jest zobrazowane ryciną wykonaną przez doktorantkę przy użyciu programu BioRender. Doktorantka nie uniknęła drobnych błędów edytorskich, jednakże przy tak obszernym tekście jest to raczej nie do uniknięcia i oczywiście nie rzutuje to w żaden sposób na jakość. Wstęp literaturowy stanowi doskonały materiał wyjściowy do przygotowania pracy przeglądowej.

Cele i teza badań jest jasno przedstawiona. Punktem wyjścia do badań doktorantki są wcześniejsze wyniki uzyskane przez grupę prof. Marka Rusina dotyczące aktywacji p53 pod wpływem mieszaniny aktywnomycyny D i nutliny-3a. Aktywna forma p53 reguluje ekspresję wielu genów, w tym genów związanych z układem immunologicznym. Doktorantka postawiła tezę, że zaktywowane białko p53 moduluje ekspresję białek układu odpornościowego co w konsekwencji prowadzi do skuteczniejszego zwalczania komórek nowotworowych.

W rozdziale materiały i metody doktorantka w sposób uporządkowany i systematyczny przedstawia wykorzystane w badaniach materiały, metody i układy modelowe jakimi są linie komórkowe o różnym statusie p53. Tu warto wskazać jak bardzo różnorodny a zarazem przemyślany układ badawczy, oparty na liniach komórkowych, został wybrany do badań. Wykazy mediów hodowlanych,

chemioterapeutyków, buforów i żeli, przeciwciał, plazmidów, starterów do reakcji RT-qPCR zostały ujęte w formach tabelarycznych co nadaje temu rozdziałowi dużej przejrzystości. Zastosowane techniki są opisane w sposób jasny, dodatkowo zobrazowane rycinami wykonanymi przez doktorantkę.

W rozdziale wyniki doktorantka przedstawia rezultaty uzyskane w toku swojej pracy. Pierwsza część dotyczy sprawdzenia jakie geny układu odpornościowego są bezpośrednio regulowane przez białko p53 w dwóch liniach komórkowych A549 (niedrobnokomórkowy rak płuc) oraz U-2 OS (kostniakomięsak) traktowanych mieszaniną aktynomycyny D i nutliny-3a. Doktorantka wykorzystwała układ badawczy oparty na liniach komórkowych z prawidłową formą p53 i ze zmniejszoną ilością funkcjonalnego białka p53. Obniżenie białka p53 zostało osiągnięte przy zastosowaniu techniki CRISPR/Cas9, który umożliwia pęknięcie dsDNA w docelowym miejscu a następnie w wyniku niehomologicznego scalenia DNA dochodzi do powstawania dysfunkcyjnego białka. Doktorantka wykazała, że zastosowanie techniki CRISPR/Cas9 doprowadziło do otrzymania heterogennej populacji komórek, w której prawdopodobnie większość z nich produkuje niefunkcjonalne białko p53 gdyż nie ulega ono fosforylacji w pozycji seryny 37 pod wpływem chemioterapeutyków. P53 jest fosforylowane w wielu pozycjach w odpowiedzi na stres. Czy doktorantka brała pod uwagę dodatkowo sprawdzenie fosforylacji np. seryny 15, seryny 46? Nieaktywne białko p53 nadal może jednak wiązać się do sekwencji docelowych o ile nadal funkcjonuje jego domena wiązania się do DNA. Czy nie lepszą strategią byłoby zastosowanie shRNA (ang. *short hairpin*) do wyciszenia genu *TP53* z wykorzystaniem systemu opartego na lentiwirusach (ang. *lentiviral vector*), który umożliwia otrzymanie linii komórkowej o pożądanym fenotypie? Ta strategia jest powszechnie stosowana w wyciszaniu genów w tym genu *TP53*. Zastosowanie metody opartej na wprowadzeniu shRNA za pomocą lentiwirusowych plazmidów wyklucza obecność dysfunkcyjnej formy p53, która może utrudniać interpretację wyników. Prosiłbym doktorantkę o odniesienie się do tego problemu. Na podstawie danych z analiz wysokoprzepustowych RNA uzyskanych przez grupę prof. Marka Rusina doktorantka wyselekcjonowała docelowe geny związane z działaniem układu immunologicznego, które mogą być regulowane przez p53 i przeprowadziła analizę ekspresji tych genów na etapie transkrypcji za pomocą techniki RT-qPCR w obydwu linach zarówno z dziką formą p53 jak i w liniach modyfikowanych z obniżoną ilością funkcjonalnego białka p53. Analiza ta pozwoliła doktorantce na dalsze wyselekcjonowanie trzech genów: *SLAMF7*, *KLRG2* oraz *NCR3LG1*, dla których udowodniła z wykorzystaniem testów lucyferazowych, że mogą one być bezpośrednio regulowane przez p53.

Kolejna część rozdziału wyniki dotyczy szczegółowej analizy roli białka p53 w aktywacji białka *SLAMF7* w obecności wybranych chemioterapeutyków w różnych liniach komórkowych zarówno z dziką formą p53 jak również z mutantem p53. Na uznanie zasługuje podejście eksperymentalne mgr Inż. Agnieszki Będzińskiej oparte na wykorzystaniu kilkunastu różnych linii komórkowych do analizy ekspresji białka

SLAMF7 za pomocą techniki western blot. Uzyskane przez doktorantkę rezultaty pokazują, że p53 jest zaangażowane w modulację ekspresji genu *SLAMF7* jednak wydaje się, że jest ona zależna od rodzaju czynnika stresowego jak również typu linii komórkowej. Ciekawą obserwacją jest całkowity brak białka SLAMF7 w linii niedrobnokomórkowego raka płuc, H1299, z delecją w genie *TP53*, która skutkuje brakiem ekspresji białka p53 podczas gdy w liniach komórek białaczkowych K562 czy HL60 również pozbawionych białka p53 w wyniku mutacji/delecji obserwujemy aktywację białka SLAMF7. W jaki sposób można by wyjaśnić tak rozbieżne wyniki otrzymane dla linii komórkowych cechujących się brakiem funkcjonalnego białka p53? Z drugiej strony w linii komórkowej wywodzącej się z nowotworu jamy ustnej, UD-SCC-2, z dziką formą p53 nie obserwuje się aktywacji białka SLAMF7 w obecności żadnego z zastosowanych chemioterapeutyków. Czy na podstawie tak rozbieżnych wyników uzyskanych dla wielu linii komórkowych można przedstawić ogólny wniosek, że aktywacja białka SLAMF7 zależy od p53? Prosiłabym doktorantkę o komentarz.

Następnie w rozdziale wyniki doktorantka przedstawia serię eksperymentów wykazujących zaangażowanie białka p53 w cytotoksycznym mechanizmie komórek NK-92 w ko-kulturach z komórkami A549 oraz w regulację szlaków interferonów, INF- α 1 i INF- γ . Badania na komórkach nie wykazujących ekspresji p53: H1299, H358 oraz Saos-2, pokazują jednak, że białka IFIT1 i IFIT3 (ang. *Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats*), które mogą stymulować komórki NK-92, są indukowane mieszaniną aktynomycyny D i nutliny-3a. To pokazuje, jak doktorantka stwierdziła, że geny te mogą być również aktywowane na drodze nie zależnej od p53. Jaki więc jest wkład p53 w aktywację tych genów w komórkach z dziką formą p53? Czy obserwowany efekt uwrażliwienia komórek NK-92 pod wpływem mieszaniny aktynomycyny D i nutliny-3a jest jednak wypadkową działania wielu szlaków zależnych i niezależnych od p53? Co ciekawe, w dużo słabszym stopniu, lub wcale nie obserwuje się zwiększonej produkcji białek IFIT1 i IFIT3 gdy chemioterapeutyki zastosowane są oddzielnie. Jak tą obserwację można by wytłumaczyć? Prosiłabym doktorantkę o komentarz do powyższych pytań.

W ostatniej części rozdziału wyniki mgr Inż. Agnieszka Będzińska analizuje wpływ p53 na aktywację genów szlaków interferonowych. Wykazanie regulatorowego wpływu na działania tych szlaków jest bardzo istotnym osiągnięciem, ponieważ umożliwia tworzenie nowych podejść w terapii przeciw nowotworowej opartych na kontrolowaniu odpowiedzi immunologicznej w celu lepszego zwalczania komórek rakowych. Tutaj doktorantka zauważa jednak, że zaangażowanie białka p53 jest komórkowo swoiste i zależne od chemioterapeutyka, co można zaobserwować np. dla białka kaspazy-1. Czy w ramach otrzymanych wyników doktorantka mogłaby zaproponować, który element/y szlaków interferonowych mogłyby stanowić cel w terapii przeciw nowotworowej?

Rozdział dyskusja jest napisana przejrzysto i bardzo ciekawie. Doktorantka prezentuje podsumowanie swoich wyników na tle najnowszej literatury wskazując nowe kierunki dalszych potencjalnych badań. Wyniki dotyczące aktywacji genów w komórkach traktowanych mieszaniną aktynomycyny D i nutliny-3a, aktywacji białka SLAMF7 w różnych liniach komórkowych oraz aktywacji genów szlaków interferonowych doktorantka zebrała w tabelę co daje możliwość bardziej globalnego spojrzenia na otrzymane rezultaty. Na końcu rozdziału znajduje się podsumowanie graficzne prezentujące otrzymane przez doktorantkę wyniki.

Podsumowując, mgr inż. Agnieszka Będzińska zrealizowała postawione cele badawcze, udowodniła eksperymentalnie regulatorową funkcję białka p53 w odpowiedzi immunologicznej, co może prowadzić do skuteczniejszego zwalczania komórek nowotworowych. Doktorantka w toku realizacji pracy wykazała się umiejętnościami w dziedzinie biologii molekularnej, inżynierii genetycznej i biologii komórki. Jakość i poziom zarówno badań, wstępu teoretycznego jak również dyskusji pokazuje jak szeroką wiedzę z dziedziny biologii komórki dysponuje doktorantka. Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.), Ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. M. Skłodowskiej-Curie, Państwowego Instytutu Badawczego o dopuszczenie mgr inż. Agnieszki Będzińskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę jakość przedstawionych wyników, ich innowacyjność i znaczenie w dalszym rozwoju badań dotyczących funkcji białka p53 w regulacji szlaków komórkowych, w tym szlaków układu immunologicznego, zwracam się do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. M. Skłodowskiej-Curie, Państwowego Instytutu Badawczego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Będzińskiej.

Dr hab. Agata Świątkowska

A. Świątkowska