

**Recenzja pracy doktorskiej mgr. Alicji Sznarkowskiej
pt. Aktywacja białka TAp73 jako strategia zwalczania komórek nowotworowych
pozbawionych białka p53**

Tematyka pracy

Przedstawiona mi do recenzji praca stanowi omówienie i dyskusję wyników badań prowadzonych przez mgr Alicję Sznarkowską nad sposobami uwrażliwiania komórek nowotworowych na czynniki terapeutyczne w wyniku aktywacji szlaku związanego z białkiem p73, homologu białka p53. Inaktywacja szlaku związanego z białkiem p53 w komórkach nowotworowych w wyniku mutacji genu, w rzadkich przypadkach jego delecji lub zwiększenia niestabilności białka prowadzi do zmniejszenia efektu działania leków i innych czynników terapeutycznych wywołwanego w komórkach nowotworowych i w konsekwencji prowadzi do oporności wielolekowej tych komórek. Ponieważ zmiany w funkcjonalności szlaku białka p53 występują stosunkowo często, dla niektórych typów nowotworów nawet w ponad 90% przypadków, oporność na indukcję procesu śmierci komórkowej na drodze np. apoptozy, wywołwanej przez czynniki terapeutycznej stanowi od lat problem dla osiągnięcia pełnej skuteczności eliminacji komórek nowotworowych z organizmu pacjenta czyli wyleczeń z choroby nowotworowej. Z tych względów tematyka pracy doktorskiej jest niezwykle ważna i aktualna.

Rola różnych mechanizmów oporności komórek nowotworowych na czynniki terapeutyczne jest szeroko badana od wielu lat i znaczenie tych badań nie może być w żadnym stopniu przecenione. Dotyczy to także deregulacji szlaków sygnalizacji wewnątrzkomórkowej prowadzących do hamowania procesu indukcji śmierci komórkowej, głównie na drodze apoptozy, związanych na przykład z inaktywacją szlaków regulowanych przez białka z rodziny p53. Próby wprowadzenia, jako składników terapii przeciwnowotworowych, związków przywracających funkcjonalność szlaku p53 w komórkach takich jak RITA, PRIMA-1, RETRA czy Nutlina-3a nie zakończyły się sukcesem ze względu na obecność w komórkach nowo scharakteryzowanych białek z tej samej rodziny (tzn. p63 czy p73) i możliwości przejścia przez nie funkcji białka p53. Stąd badania nad wykorzystaniem możliwości uruchamiania szlaku prowadzącego do śmierci komórki nowotworowej regulowanego przez białko p73, komórkach pozbawionych białka p53 są niezwykle interesujące i ważne. Są one dodatkowo obiecujące ponieważ inaktywacja szlaków białek p63 ale także p73 ze względu na obecność mutacji w ich genach w komórkach nowotworowych występuje bardzo rzadko a inne mechanizmy inaktywacji ich funkcji komórkowych np. przez wzrost ich niestabilności jest regulowany inaczej niż w przypadku białka p53. Sprawę komplikuje niestety występowanie licznych izoform np. białka p73, o zmienionej strukturze i w związku z tym funkcji komórkowych.

W pracy badano odpowiedź dwóch rodzajów komórek nowotworowych wywołwaną przez związek protoporfirynę IX, składnik terapii fotodynamicznej, związanej z funkcjami białka p73. Obejmowały one charakteryzację mechanizmów

molekularnych prowadzących do śmierci komórkowej i roli białka p53 i jego analogu białka p73 w tych procesie. Wcześniejsze badania grupy badawczej prof. Bielawskiego i dr Zawadzkiej-Pankau wykazały, że protoporfiryna IX wywołuje efekt cytotoksyczny w komórkach nowotworowych niezależnie od indukcji efektu fotodynamicznego, głównie dzięki bezpośredniemu oddziaływaniu z białkiem p53 co prowadziło do jego stabilizacji poprzez zaburzenie wiązania się ligazy ubikwitynowej MDM2.

W recenzowanej pracy wykazano, że protoporfiryna indukuje chroniczny stres retikulum endoplazmatycznego oraz proces autofagii co łącznie prowadzi do uruchomienia procesu śmierci komórkowej na drodze apoptozy. Mechanizm molekularny efektu wywoływanego przez protoporfirynę IX obejmował wiązanie się z białkiem p73 (izoforma TAp73) i jego stabilizację w wyniku wiązania się z białkami Itch, MDM2 i NQO1 odpowiedzialnymi za odporność białka p73 na degradację w komórce. Co ważne większość elementów mechanizmu molekularnego opisanego dla modeli komórek hodowanych in vitro, potwierdzono również w modelu komórek nowotworowych HCT-116 TP53^{-/-} u myszy.

Układ pracy

Praca ma układ odpowiadający klasycznemu formatowi prac doktorskich i stanowi omówienie tematyki pracy oraz uzyskanych wyników prac eksperymentalnych wraz z ich dyskusją, w odniesieniu do wcześniej opublikowanych artykułów z tej dziedziny. Z zainteresowaniem przeczytałem wprowadzenie w części Wstęp, w którym przedstawiono aktualny stan wiedzy dotyczący szlaków regulowanych przez białka z rodziny p53, szlaki śmierci komórkowej na drodze apoptozy oraz ścieżki alternatywne prowadzące do zabicia komórki takie jak stres retikulum endoplazmatycznego czy autofagia. Część tego opracowania, dotycząca szlaków komórkowych regulowanych przez białko p73, zawarta została w artykule opublikowanym z udziałem Kandydatki, w pracy przeglądowej w wysokonotowanym czasopiśmie Cell Cycle oraz w dwóch artykułach przeglądowych w języku polskim w Postęпах Higieny i Medycyny Doświadczalnej.

W części Materiały i Metody opisane najważniejsze procedury eksperymentalne i użyte materiały używane podczas badań związanych z realizacją zadań pracy. Część wyników zawarta jest w dwóch artykułach opublikowanych w czasopismach naukowych, o wysokich współczynnikach oddziaływania. Omówienie badań zakończone jest krótkim podsumowaniem co porządkuje główne tezy wyjaśniane w czasie prac badawczych. Całość kończy spis literatury, który obejmuje 155 pozycje, właściwie dobrane i cytowane.

Prace związane z realizacją tej pracy doktorskiej obejmują trzy artykuły opublikowane w czasopismach o dużym znaczeniu w dziedzinie więc trudno nie docenić ich wartości naukowej, o współczynnikach oddziaływania IF od 3,169 do 5,014 (wg Journal Citation Reports z 2014). Artykuły związane z tematyką pracy i przedstawiające również wyniki uzyskane w trakcie realizacji pracy doktorskiej oczywiście nie podlegają mojej ocenie, ponieważ miały one swoich recenzentów i to być może dużo bardziej kompetentnych niż moja skromna osoba.

Nie znalazłem w pracy żadnych istotnych błędów/nieścisłości językowych czy edytorskich.

Dla przekonania wszystkich, że pracę starannie przeczytałem oraz z obowiązku recenzenta podaję kilka przykładów, drobnych potknięć w tekście:

nazwa Hercepin® nie jest prawidłowa; str. 10 Wstęp
brak słowa ...**łagodny** chroniczny...; str. 10 Wstęp
w nazwisku ...Fraum**enni**... jest literówka; str. 10 Wstęp, podobnie ... Bufor Laem**li**...;
str. 42 Metody czy **eagle's** (to nazwisko więc powinno być z dużej litery); str. 40
Metody
istnieje polski odpowiednik słowa 'screening' – badania przesiewowe (str. 30, Wstęp)
podobnie 'xenograft' to ksenoprzeszczep (str. 31, Wstęp)
frazą '...finalnie transmitowane...' jest także chyba niezbyt zręcznym tłumaczeniem
odpowiednika anglojęzycznego (str. 33, Wstęp).

Uwagi i komentarze

Dla potrzeb dyskusji w czasie obrony pracy doktorskiej Kandydatki, chciałbym zadać kilka pytań, które mogą dodatkowo wyjaśnić pewne aspekty nie wystarczająco, moim zdaniem, omówione w recenzowanej pracy.

Z punktu widzenia farmakologa, za jakiego się uważam, istnieje problem dawek stosowanych podczas badań mechanistycznych nad efektami biologicznymi wywoływanymi przez badane związki, zwłaszcza protoporfirynę IX i cisplatynę w komórkach nowotworowych.

Jest to istotne być może istotne ponieważ można przypuszczać, że może wielość szlaków (apoptoza, autofagia, inne?) uruchamianych przy tych dawkach badanych związków wynika z tego właśnie efektu - niskiego i formalnie nieskutecznego terapeutycznie stężenia związków cytotoksycznych. Proszę o wyjaśnienie kryteriów doboru dawek badanych związków.

Mam także pytanie dlaczego protoporfiryna IX nie lokalizuje się w jądrze? Jaki jest w ogóle mechanizm wnikania tego związku do komórki?

Dlaczego generacja ROS w komórce przez PpIX (na przykład bezpośrednio czy też pośrednio – ze względu na hamowanie aktywności reduktazy tioredoksyny TrxP1) nie może prowadzić do uszkodzeń DNA? Czy wynika to ze względu na lokalizację związku głównie w ER co prowadzi do zakłócenia fałdowania białek i stresu ER bez wpływu na integralność DNA w jądrze?

Rola autofagii jako szlaku, w założeniu, chroniącego komórkę przed stresem indukowanym np. przez działanie cytostatyków bądź procesu przyspieszającego śmierć komórkową jest rzeczywiście dyskusyjny. Z pewnością może być to alternatywny szlak prowadzący do śmierci ze względu na to, że apoptoza wymaga odpowiednio wysokich stężeń ATP w komórce, podobnie jak autofagia. W wyniku obniżenia stężenia ATP zużytego podczas prowadzenia procesu autofagii komórka może podlegać śmierci nekrotycznej, być może nawet programowanej. Prosiłbym o krótki komentarz na ten temat w czasie obrony.

Podsumowanie

Pomimo przedstawionych wyżej kilku moich uwag czasami o charakterze polemicznym, które zwłaszcza w kwestiach ogólnych mają być jedynie pretekstem do dyskusji naukowej z Doktorantką podczas obrony pracy, wysoko oceniam przedstawioną mi do recenzji pracę Pani Alicji Sznarkowskiej pt. "**Aktywacja białka TAp73 jako strategia zwalczania komórek nowotworowych pozbawionych białka p53**". Stanowi ona dokumentację oryginalnych badań prowadzonych przez

Doktorantkę, o wysokich walorach naukowych i poznawczych oraz obdarzonych potencjałem co do zastosowań praktycznych jako nowej strategii eliminacji komórek nowotworowych.

Moim zdaniem praca doktorska Pani Sznarkowskiej w pełni spełnia formalne wymagania stawiane pracom doktorskim, podane w zapisach Ustawy o tytule i stopniach naukowych. Praca wskazuje także, że Doktorantka posiada dużą wiedzę teoretyczną, jeśli chodzi o mechanizmy regulujące proces śmierci komórkowej czy autofagii indukowanych przez szlaki sygnalizacji wewnątrzkomórkowej związane z funkcjonalnością białka p73.

Podczas realizacji celów pracy doktorskiej miała ona możliwość skutecznego zastosowania dużej ilości metod i technik laboratoryjnych. W toku realizacji pracy wykazała umiejętność planowania i prowadzenia badań naukowych oraz krytycznej analizy i interpretacji uzyskanych wyników. Z podanych wyżej względów przedkładam Wysokiej Radzie Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego mój wniosek o dopuszczenie Pani Alicji Sznarkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jak wspomniałem wyżej, Kandydatka jest współautorem trzech artykułów w tematyce pracy w języku angielskim i dwóch prac w języku polskim w czasopismach naukowych o dużym znaczeniu w dziedzinie. Dodatkowo realizacja tej pracy doprowadziła do otrzymania niezwykle interesujących i ważnych, również ze względów potencjalnych zastosowań praktycznych, danych eksperymentalnych. Z tych względów wnioskuję o rozważenie możliwości wyróżnienia tej pracy.

Andrzej Sznarkowski

Gdańsk, 21 czerwca 2015