

Recenzja pracy doktorskiej
mgr Aleksandry Pęczak zatytułowanej " Poszukiwanie i charakterystyka
nowych inhibitorów oddziaływania białek MDM2/MDMX z białkiem p53"

Przedstawiona do recenzji praca wykonana jest pod kierunkiem prof. Adama Dubina i dr hab. Grzegorza Dubina (promotor pomocniczy) oraz przedstawiona Radzie Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w celu uzyskania stopnia doktora.

Praca zawiera obszerny wstęp (44 strony), który wprowadza czytelnika w tematykę zagadnienia. Zawiera on w większości informacje rzetelne, cytowania literatury są prawidłowe. Świadczy to o głębokiej wiedzy Doktorantki. Szkoda jednak, że bardzo mało uwagi poświęcono roli MDM2/MDMX w reakcjach w komórce niezależnych od p53. Po pierwsze, istnieją doświadczenia *in vivo* (Vargas i wsp. 2003), wskazujące na to, że myszy (*Trp53*^{-/-}) w obecności ekspresji genu *Mdm2* mają zwiększone prawdopodobieństwo powstawania spontanicznych nowotworów; spektrum tych nowotworów jest inne niż w przypadku myszy (*Trp53*^{-/-}; *Mdm2*^{-/-}). Na stronie 35 Doktorantka wymienia wprawdzie niektóre reakcje, w których MDM2 jest zaangażowane w oddziaływanie z innymi białkami niż p53, ale brakuje stwierdzenia, że MDM2 działa nie tylko i wyłącznie w szlaku sygnałowym p53. Myślę, że utrudnia to Doktorantce interpretację uzyskanych wyników. Przy okazji, prosiłbym o wyjaśnienie stwierdzenia znajdującego się w tabeli 5 na stronie 35: „wiązanie MDM2 do p73 hamuje aktywność transkrypcyjną p73 i prowadzi do indukcji apoptozy”. Zgadza się, że aktywność transkrypcyjna TAp73 jest hamowana przez MDM2 (w naszym laboratorium także widzimy podobną zależność), ale to powinno zahamować ekspresję *BAX* (genu indukującego apoptozę), czyli powinno zahamować apoptozę, a nie, jak twierdzi Doktorantka, indukować apoptozę. TAp73 jest odpowiedzialny, między innymi, za ekspresję genów pro-apoptotycznych, w tym genu *BAX*. Poza tym efekt hamowania apoptozy zależny od TAp73 przez MDM2 zależy także od statusu *TP53* w komórce. Jeśli gen ten jest zmutowany i białkowy produkt tego genu zmienia konformację (np. w przypadku mutacji w kodonie R175H), powstaje wówczas trójskładnikowy kompleks TAp73-p53R175H-MDM2, w którym aktywność pro-apoptotyczna TAp73 jest zablokowana (Tracz-Gaszewska i wsp. 2017). We wstępie i w dyskusji brakuje mi także bardziej rozbudowanej informacji o tym, że inhibitor MDM2 – Nutlina-3a posiada nie tylko właściwości antagonistyczne w stosunku do oddziaływań MDM2-p53 ale również może działać jako agonista w sieci oddziaływań tych białek (Landre i wsp. 2017; Tracz-Gaszewska i wsp. 2017; Wawrzynów i wsp. 2018). We wstępie Doktorantka podaje informacje, że MDM2 hamuje translację mRNA *TP53* poprzez proteasomalną degradację białka rybosomalnego L26 (strona 36), jednak równolegle nie wspomina o bardzo ciekawych pracach wykonanych w zespole Farhaeus'a. (np. Cancer Cell, 2012 i późniejsze) wskazujących na to, że aktywacja kinazy stresowej ATM wpływa na zmianę roli MDM2 z onkogennej na supresorową. Po aktywacji ATM, MDM2 wpływa pozytywnie na translację mRNA kodującego p53.

W rozdziale „Wyniki” Doktorantka w celu opracowania metody przesiewowej do badania inhibitorów kompleksu MDM2/MDMX z białkiem 53 postanowiła monitorować (stosując polaryzację światła fluorescencji)

oddziaływanie fragmentów N-końcowych białka MDM2 (1-118 aminokwasów) oraz białka MDMX (1-134 aminokwasów) z peptydami, znakowanym karboksyfluoresceiną, pochodzącymi z fragmentów białka p53 (lub innymi peptydami oddziałującymi z MDM2 i MDMX - peptyd P4 oddziałujący zarówno z MDM2 jak i MDMX wyselekcjonowany z biblioteki bakteriofagowej). Wykonała optymalizację testu w zakresie zakresu doboru stężeń, stabilności testu w czasie oraz technicznych parametrów (odpowiednie płytki do czytnika umożliwiającego pomiar polaryzacji fluorescencji). Wykazała, że współczynnik polaryzacji peptydu fluorescencyjnego rośnie po związaniu stechiometrycznej ilości N-końcowych fragmentów MDM2 i MDMX i reakcja ta uzyskuje wartość równowagowej stałej dysocjacji $K_d=3,6$ nM dla MDM2 i $K_d=6,1$ nM dla MDMX. Po dodaniu antagonistów tworzenia się kompleksów MDM2/MDMX z p53 (np. Nutlina-3a) współczynnik polaryzacji peptydu fluorescencyjnego P4 związanego z fragmentami białek p53 malał stechiometrycznie, co sugeruje wypieranie znakowanego peptydu z kompleksów MDM2/MDMX przez antagonistów tego oddziaływania. Wykonane testy kompetycyjne dla szeregu znanych z literatury peptydów jak i niskocząsteczkowych związków chemicznych hamujących oddziaływanie MDM2/MDMX z p53 wykazały dobrą zgodność równowagowych stałych inhibicji (K_i) z danymi literaturowymi. Wykonano także analizę skuteczności, opracowanej w ramach doktoratu, przesiewowej metody wykrywania antagonistów oddziaływania MDM2/MDMX z peptydem pochodzącym z p53 stosując polaryzację światła fluorescencji. Wykazano skuteczność tej metody w stosunku do niespecyficznych czynników mogących wpływać na to oddziaływanie. Ten fragment pracy doktorskiej został opublikowany w pracy Cell Cycle, 2009 oraz opatentowany (#P.387416). Recenzent docenia skuteczność ustawionej metody, jednak zwraca uwagę, że metoda ta nie gwarantuje, iż wyselekcjonowane niskocząsteczkowe substancje będą *in vivo* specyficznie konkurować z oddziaływaniem MDM2/MDMX z białkiem supresorowym p53. Po pierwsze, w teście zastosowano jedynie fragmenty N-końcowe białek MDM2 i MDMX, całe białka mogą związać się inaczej i oddziaływać z p53. Na żadnym etapie izolacji tych fragmentów białek nie sprawdzono czy są one prawidłowo zwinięte. Fragmenty w/w białek posiadały metki histydynowe, które mogą wpływać na zwijanie się fragmentów białek. W toku izolacji białek metki te nie zostały odcięte. Izolacja fragmentu białka MDM2 była drastycznie różna od izolacji fragmentu MDMX. W przypadku MDM2 białko odzyskiwano z ciałek inkluzyjnych poprzez denaturację i powtórne zwijanie. W tych warunkach może dojść do nieprawidłowej renaturacji białka, co może mieć wpływ na oddziaływanie takiego białka z innymi białkami lub niskocząsteczkowymi związkami chemicznymi. W przeciwieństwie do MDM2, białko MDMX było izolowane z rozpuszczalnej frakcji białek. Peptyd P4, niekoniecznie musi odwzorować/„mimikować” oddziaływanie N-końcowej domeny p53 z MDM2 lub MDMX. Zastosowana metoda polaryzacji światła fluorescencji może mieć jednak swoje zalety (choć jako fizyk wolałbym wyznaczać anizotropię emisji a nie polaryzację fluorescencji). Ciekawe byłoby porównanie zastosowania opracowanej metody z testem ELISA, w którym badana byłaby inhibicja oddziaływania całych MDM2 i MDMX z całym białkiem p53. Izolacja aktywnych białek MDM2, MDMX i p53 jest możliwa.

Stosując opracowany test kompetycyjny Doktorantka przebadła kilkanaście pochodnych znanego z literatury niskocząsteczkowego związku SJ-

172550. Niektóre z tych pochodnych, jak np. 2K01 lub 4K67, posiadały mikromolową stałą inhibicji (odpowiednio $K_i=1,76$ mikroM dla 2K01 lub $K_i=0,99$ mikroM dla 4K67) względem kompleksu MDMX-peptyd p53. Dotychczasowo nie udało się znaleźć niskocząsteczkowego związku chemicznego, który wydajnie hamowałby powstawanie kompleksu MDMX-p53. Dalsza analiza molekularnego mechanizmu inhibicji pochodnych SJ wskazała, że związki te wydajnie modyfikują kowalencyjnie grupy sulfhydrylowe reszt cysteinowych fragmentów N-końcowych pochodzących z MDM2 i MDMX. W tym celu doktorantka zastosowała technikę spektroskopii masowej i określała masę cząsteczkową N-końcowej domeny MDM2 lub MDMX w obecności lub nieobecności związków SJ. Jednoznacznie wykazała, że obecność wybranych pochodnych SJ (4T14 lub 2K01) można zidentyfikować w N-końcowych fragmentach MDM2 lub MDMX o zwiększonej masie cząsteczkowej, co sugerowało modyfikację pojedynczej cysteiny (C77- dla MDM2 lub C76 dla MDMX). Podobne doświadczenia powtórzono przy zastosowaniu fragmentów białka MDM2 lub MDMX, w których cysteina była zastąpiona alaniną (C77A lub C76A). W tym przypadku nie wykazano powstawania zwiększonej masy cząsteczkowej fragmentów MDM2 czy MDMX. Wyniki te sugerują, że kowalencyjna modyfikacja grup sulfhydrylowych reszt cysteiny jest specyficzna. Badania strukturalne wskazują, że C77 w przypadku MDM2 oraz C76 w przypadku MDMX położone są w obrębie N-końcowej domeny tych białek odpowiedzialnej za oddziaływanie z p53, dlatego ich chemiczna modyfikacja może wpływać na zahamowanie tworzenia się kompleksu MDM2/MDMX z p53. W doświadczeniach kontrolnych Doktorantka wykazała, że zmiana aminokwasów cysteiny na alaninę (C77A) nie wpływa na wiązanie peptydu „mimikującego” p53. Podobnie klasyczny inhibitor tworzenia się kompleksu MDM2-p53, Nutlina-3a jest w stanie usunąć peptyd „mimikujący” p53 z kompleksu z MDM2 (C77A). Te dwie ostatnie kontrole sugerują, że zamiana cysteiny na alaninę w pozycji 77 fragmentu MDM2 nie zmienia globalnej konformacji tego polipeptydu. Wyniki te są opublikowane w pracy PLoS One w 2012, w której Doktorantka jest współautorką.

Równolegle do próby identyfikacji niskocząsteczkowego inhibitora tworzenia się kompleksu MDM2/MDMX- peptyd P4, Doktorantka rozpoczęła próbę wyizolowania aptamerów, które mogłyby być potencjalnie inhibitorami MDM2 i MDMX w reakcji wiązania do p53. W tym celu przeprowadziła pięć niezależnych selekcji *in vitro* aptamerów wiążących się z N-końcową domeną MDM2 (1-118). Doktorantka zastosowała trzy biblioteki aptamerów różniące się, między innymi, długością oligonukleotydów. Metoda selekcji, w literaturze nazwana SELEX, polegała na tym, że immobilizowany na złożu polipeptyd pochodzący z MDM2 był inkubowany z różnymi bibliotekami jednoniciowego DNA (ssDNA). Po procedurze usuwania ssDNA niespecyficznie związanych z MDM2 (poszczególne procedury różniły się właśnie tym etapem) zastosowano klasyczny PCR w celu powielenia oddziałujących z MDM2 sekwencji ssDNA. Tak wyselekcjonowane i powielone oligonukleotydy były powtórnie inkubowane z fragmentem MDM2 i procedura selekcji była powtarzana wielokrotnie. W celu wyeliminowania sekwencji niespecyficznie oddziałujących z fragmentem MDM2 Doktorantka stosowała selekcję negatywną, obejmującą inkubację puli ssDNA z poprzedniego cyklu z nadmiarem nieopłaszczzonego złoża (bez fragmentu MDM2). Każdy cykl selekcji specyficznych ssDNA był ponadto wykonywany w obecności molowego nadmiaru drożdżowego tRNA i BSA jako czynników

„wyplaszających” niespecyficzne wiązanie ssDNA do fragmentu MDM2. W celu monitorowania procedury selekcji ssDNA oddziałujących z fragmentem MDM2, Doktorantka wykonała test wiązania oparty na ilościowym PCR. Amplifikacji poddawano ssDNA przed inkubacją z MDM2 oraz po każdym cyklu wiązania i odmywania niespecyficznych ssDNA. W ten sposób wyznaczano, dla każdego cyklu, stosunek ssDNA związanego z białkiem do początkowej ilości ssDNA. W ten sposób monitorowano także wzbogacanie mieszaniny ssDNA w sekwencje specyficznie wiążące się z fragmentem białka MDM2. Po 10 cyklach uzyskiwano 40-krotne wzbogacenie specyficznych sekwencji ssDNA. Następne cykle nie wpływały znacząco na zwiększenie liczby specyficznych sekwencji ssDNA związanych z fragmentem MDM2. Po ostatnim cyklu selekcji mieszaninę sekwencji ssDNA wklonowano w odpowiednie wektory i zsekwencionowano. W ten sposób identyfikowano powtarzające się sekwencje a następnie, stosując ilościowy PCR, powtórnie badano ich wiązanie do fragmentu białka MDM2. Zidentyfikowano 43 sekwencje ssDNA mające duże powinowactwo do MDM2 i zbadano ich powinowactwo nie tylko do MDM2 ale także MDMX oraz GST (GST zawiera także metkę histydynową podobnie jak MDM2 czy MDMX). Doktorantka wyznaczała także wiązanie się badanych sekwencji do złoża niezwiązanego z w/w białkami. Wyselekcjonowane na wiązanie z MDM2 aptamery nie wiązały się do MDMX i posiadały małe powinowactwo do GST. Przy dalszej pracy pominięto sekwencje ssDNA, które miały znaczące powinowactwo do samego złoża. Aptamery oddziałujące z największym powinowactwem z fragmentem MDM2, były zsyntetyzowane *in vitro*, biotynylowane i ich powinowactwo do fragmentu MDM2 było weryfikowane stosując niezależne techniki ELISA (fragment MDM2 immobilizowany na pastykowych płytkach). W celu zidentyfikowania minimalnej sekwencji ssDNA oddziałującej z fragmentem MDM2 wybrano sekwencje ssDNA mające wysokie powinowactwo do tego białka ale jednocześnie różniące się najbardziej swoją sekwencją nukleotydową. Dla tak wyselekcjonowanych oligonukleotydów zsyntetyzowano warianty posiadające kolejne 10-nukleotydowe odcinki sekwencji zastąpione nukleotydami adeninowymi. Stosując tę metodę zidentyfikowano rejony aptamerów, które w wyniku wstawienia sekwencji adeninowych utraciły zdolność do wiązania z fragmentem MDM2. Ostatecznie, Doktorantka zidentyfikowała 35-nukleotydową sekwencję oddziałującą specyficznie z fragmentem MDM2. Co ciekawe, skrócony aptamer posiadał większe powinowactwo do fragmentu MDM2 niż wyjściowy aptamer o długości 85 nukleotydów. Dalsze próby skrócenia sekwencji aptameru, nazwanego 911C-E, doprowadzały do utraty powinowactwa do fragmentu MDM2 co sugeruje, że ten 35-nukleotydowy fragment DNA stanowi minimalny motyw DNA odpowiedzialny za wiązanie z N-końcową domeną białka MDM2. Stosując podobne procedury minimalizacji sekwencji ssDNA oddziałujących z MDM2, startując z innych bibliotek - zidentyfikowano szereg fragmentów ssDNA – np. motyw C42m1 (35 nukleotydów), który z dużym powinowactwem także wiązał się do tego samego fragmentu MDM2. Niezależne testy ELISA szacujące powinowactwo minimalnych sekwencji nukleotydowych do fragmentu MDM2, doprowadziły Doktorantkę do identyfikacji pięciu motywów sekwencji nukleotydowej specyficznie oddziałujących z fragmentem MDM2, w tym sekwencji C42m1, która posiada zdecydowanie najwyższe powinowactwo do MDM2.

Stosując analizę *in silico* wszystkich 350 sekwencji (pełnej długości), które dla różnych stosowanych bibliotek posiadały powinowactwo do fragmentu MDM2, zidentyfikowano kilka potencjalnych motywów mogących oddziaływać z fragmentem MDM2. Zsyntetyzowano *in vitro* te oligonukleotydy i, stosując test ELISA, porównano ich powinowactwo do fragmentu MDM2. Jako kontrolę pozytywną Doktorantka użyła 35 nukleotydomowe sekwencje C42m1 oraz 911C-E, które uprzednio zidentyfikowała jako minimalne sekwencje nukleotydomowe oddziałujące z fragmentem MDM2. W ten sposób Doktorantka zidentyfikowała także sekwencję 35 nukleotydomową Mot1MOD, która posiadała większe powinowactwo do MDM2 niż sekwencja C42m1. Biochemiczna charakterystyka trzech sekwencji oligonukleotydomowych: 911C-E, C42m1 oraz Mot1MOD wskazuje na to, że te oligonukleotydy oddziałują z MDM2 ale nie wiążą się z MDMX (test ELISA oraz test EMSA-opóźnionej migracji oligonukleotydomów po związaniu z fragmentem białka). Co ciekawe, zaobserwowano pewne ograniczone powinowactwo Mot1MOD do fragmentu MDMX. W celu wyznaczenia stałych dysocjacji Kd kompleksów aptamer-fragment białka MDM2, Doktorantka zastosowała dwie metody: określania polaryzacji fluorescencji barwnika związanego z aptamerem przy wzrastającym stężeniu fragmentu MDM2 oraz powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR), gdzie biotynylowane aptamery były immobilizowane na sensorach pokrytych streptawidyną a roztwór analitu posiadał różne stężenia fragmentu MDM2. Obydwie metody wyznaczania Kd dały różne rezultaty. Podobnie w przypadku stosowania testu kompetycyjnego, Ki wyznaczone w tym przypadku różniło się znacząco od Kd, co sugeruje że zarówno znakowanie fluorescencyjne jak i biotynylowanie aptamerów może zaburzać równowagę tworzenia się kompleksu MDM2-aptamer.

Doktorantka przetestowała także stabilność aptameru Mot1MOD w obecności pożywki wzbogaconej surowicą ludzką (10%) oraz w warunkach hodowli komórek nowotworowych A549 oraz PC-3. W obu przypadkach, po 24h inkubacji, Doktorantka nie zauważyła znaczącej degradacji aptameru. Wykonała także pewne doświadczenia *in vitro* na liniach komórkowych, które według Niej wskazują, na to, że w obecności aptameru Mot1MOD komórki nowotworowe gruczolaka płuc, A549 (p53 +/+) słabiej proliferują niż komórki raka prostaty PC-3 (p53-/-). Powołując się na te wyniki, Doktorantka pisze, że zaobserwowany efekt różnicy proliferacji komórek p53+/+ w stosunku do proliferacji komórek p53-/- „wskazuje na mechanizm działania aptameru Mot1MOD poprzez modulację funkcji białka MDM2”. W podsumowaniu wyników (str. 177) występuje stwierdzenie: „najistotniejszym eksperymentem było wykazanie, iż skrócony aptamer Mot1MOD wybiórczo obniża żywotność komórek nowotworowych p53 (+/+) a nie komórek p53 (-/-)”. Niestety te stwierdzenia są za daleko idące i istnieje duża szansa, że mogą być nieprawdziwe:

1. W doświadczeniu nie ma kontroli, że aptamer wchodzi do komórki.
2. Doktorantka porównuje dwie linie komórkowe z różnych nowotworów, które wprawdzie różnią się statusem p53, ale także i ekspresją setek innych genów. Doktorantka nawet nie porównała ekspresji genu *MDM2* w tych komórkach, nie ma także kontroli negatywnej zahamowania ekspresji *TP53* w A549 (p53 +/+) i indukcji egzogennej ekspresji *TP53* w komórkach PC-3 (p53-/-). Jaki jest poziom ekspresji genu *MDMX*, którego białkowy produkt w komórce tworzy kompleks z MDM2? Aptamer może

- zmieniać powinowactwo tych dwóch białek względem siebie i w konsekwencji wpływać na aktywność p53 (Medina-Medina i wsp. 2018)
3. W komórkach PC-3 (p53^{-/-}) aptamer Mot1MOD także hamuje proliferację komórek, aczkolwiek nie tak wydajnie jak w przypadku A549 (p53^{+/+}).
 4. Hamowanie proliferacji w przypadku obu rodzajów komórek jest zależne od stężenia aptameru. Jednakże stosowane stężenia tego aptameru są bardzo wysokie. Dlaczego nie zastosowano, jako kontroli Nutliny-3a?
 5. Białko MDM2 oddziałuje z ok. 100 innymi białkami w komórce, dlatego aptamery wyselekcjonowane na wiązanie do MDM2 nie tylko mogą modulować oddziaływanie p53-MDM2 ale także np. z E2F1, RB i wieloma innymi kluczowymi elementami szlaków sygnałowych w komórce. Jak wyjaśnić efekt hamowania proliferacji komórek PC-3 (p53^{-/-}) przez aptamer C42m1? Doktorantka pisze: „ aptamer C42m1 charakteryzuje się niespecyficznym działaniem antyproliferacyjnym względem komórek PC-3 (p53^{-/-})”. Co to znaczy niespecyficznym? Może być specyficzny ale nie do statusu *TP53* tylko do innego genu supresorowego?

W podsumowaniu, Doktorantka wykonała metodycznie bardzo dojrzałą pracę w ustawieniu testu kompetycyjnego w celu szukania niskocząsteczkowych związków, które będą konkurowały z peptydami pochodzącymi z N-końcowego fragmentu p53 o wiązanie z N-końcowym fragmentem MDM2 i MDMX. Test ten został zweryfikowany dla uprzednio zidentyfikowanych przez innych autorów peptydów oraz związków SJ, które były inhibitorami oddziaływania MDM2/MDMX-p53. Doktorantka znalazła pochodne związków SJ, które były wydajniejszymi inhibitorami badanej reakcji. Dalsze badania wykonane przez Doktorantkę w elegancki sposób wykazały, że związki te specyficznie, kowalencyjnie, modyfikowały grupę sulfhydrylową reszt cystein obecnych we fragmentach białka MDM2 i MDMX.

W drugiej części pracy doktorskiej Doktorantka zidentyfikowała sekwencje aptamerowe o długości 35 nukleotydów, które z dużym powinowactwem wiązały się z N-końcowym fragmentem białka MDM2. Była to gigantyczna praca polegająca na wieloetapowej selekcji dużych sekwencji oligonukleotydowych (pochodzących z trzech różnych bibliotek) wiążących się z MDM2, klonowanie wstępnie wyselekcjonowanych sekwencji i wyszukiwanie minimalnej sekwencji oligonukleotydowej odpowiedzialnej za wiązanie z MDM2, synteza *in vitro* optymalnych sekwencji i sprawdzanie (stosując testy ELISA, EMSA, Western Blot i SPR) czy wyselekcjonowane sekwencje oligonukleotydowe rzeczywiście wiążą się z N-końcowym fragmentem MDM2 (wyznaczone stałe dysocjacji mieściły się w przedziale od 300 nM do 2 mikroM). Zdaniem recenzenta, tylko ten fragment pracy Pani mgr Aleksandry Pęczak wystarczyłby na dysertację doktorską. Uzyskane wyniki są oryginalne i w przyszłości mogą doprowadzić do wyselekcjonowania wydajnego inhibitora wiązania MDM2/MDMX z p53. Elementy krytyki zawarte w tej recenzji nie mają na celu dyskredytowania gigantycznej pracy wykonanej przez Doktorantkę, a jedynie stymulowanie dyskusji naukowej, która powinna być nieodzownym elementem naszej naukowej pracy. Pamiętajmy o tym, że Doktorantka podjęła się bardzo

trudnego zadania znalezienia nowych inhibitorów oddziaływania białek MDM2/MDMX z białkiem p53. Co roku ukazuje się tysiące prac na temat pętli oddziaływania MDM2/MDMX z p53, ponadto silne są przesłanki do tego aby uważać, że oddziaływanie MDM2 z p53 jest jedynie „czubkiem góry lodowej”, gdyż MDM2 oddziałuje z wieloma innymi białkami nie należącymi do szlaku sygnałowego p53. Na temat MDMX wiemy jeszcze mniej. Dodatkowo, część publikowanych prac z zakresu MDM2/MDMX/p53 nawzajem sobie przeczy. Recenzent nie uzurpuje sobie prawa nieomyślności w zawartych w tej recenzji uwagach krytycznych, chciałbym jedynie zapoczątkować w czasie obrony dysertacji doktorskiej dyskusję naukową na ten temat. Uważam, że doktorat jest bardzo dobry, zawiera oryginalne wyniki naukowe i tylko dlatego pozwalam sobie nieśmiało na zainicjowanie takiej dyskusji wierząc, że w Doktorantce znajdę godnego partnera do takiej dyskusji.

Reasumując, pracę doktorską Pani Aleksandry Pęczak oceniam bardzo wysoko. Uważam, że stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i całkowicie spełnia wymagania formalne i merytoryczne stawiane pracom doktorskim określone w art. 13 ustawy o stopniach i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 wraz z późniejszymi zmianami. Wnioskuje zatem do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Aleksandry Pęczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



/Maciej Żylicz/

Warszawa, 5 maja 2019 r.