

Prof. dr hab. Tomasz Śliwiński
Zakład Biochemii Medycznej
Wydział Nauk o Zdrowiu
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Łukasza Komorowskiego

Lymphoid-specific role of the thioredoxin system in survival and drug sensitivity of leukemia with BCR-ABL1 translocation

Przewlekła białaczka szpikową (CML) należy do grupy nowotworów mieloproliferacyjnych charakteryzujących się niekontrolowany wzrost komórek szpiku na różnych etapach. Cechą charakterystyczną oraz główną onkoproteiną dla tego typu białaczki jest kinaza BCR-ABL, przyczyniająca się do niestabilności genomowej, genetycznej dywersyfikacji, ekspansji klonalnej oraz selekcji. Mechanizmy te składają się na złożony mechanizm ewolucji klonalnej, której przebieg wiąże się ze stopniem zaawansowania choroby. Odkrycie ponad 20 lat temu swoistych inhibitorów kinazy tyrozynowej BCR-ABL zrewolucjonizowało leczenie pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową. Skuteczność leczenia pacjentów i rokowanie uległy znacznej poprawie, a postęp w stosowaniu inhibitorów kinazy tyrozynowej trwa.

Poza CML, chromosom Ph występuje również u części chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną z prekursorów limfocytów B (B-ALL). B-ALL jest częstym nowotworem pediatrycznym, charakteryzującym się akumulacją niedojrzałych limfocytów, jednak może on także pojawiać się w niskim procencie również u dorosłych. Wśród najbardziej rozpowszechnionych podtypów wysokiego ryzyka tego typu białaczki jest ten zawierający chromosom Ph (Ph+ B-ALL), charakteryzujący się translokacją BCR/ABL1. W przeciwieństwie do CML, sama ekspresja onkogenu BCR-ABL1 jest niewystarczająca do złośliwej transformacji w komórkach B i do rozwoju tego podtypu białaczki wymagane są dodatkowe mutacje, co wskazuje na bardziej złożoną konstrukcję genetyczną Ph+ B-ALL. W leczeniu B-ALL stosowana jest głównie chemioterapia, jednak w wielu przypadkach choroba nawraca w trudnej do leczenia, lekoopornej postaci. Z tego powodu są pilnie potrzebne nowe strategie leczenia. Istotnym elementem badań o charakterze terapeutycznym jest nie tylko poszukiwanie nowych inhibitorów jak następnych generacji w porównaniu do imatinibu, lecz również ciągle ocena

skuteczności leczenia, w tym poszukiwanie potencjalnych mechanizmów indukujących oporność komórek białaczek.

Podtyp Ph+ B-ALL związany jest z wysokim, około 50% ryzykiem nawrotu choroby i niekorzystnym rokowaniem. Z tego względu bardzo istotne jest poszukiwanie nowych celów w terapii Ph+ B-ALL.

Wiele typów nowotworów charakteryzuje zaburzenie homeostazy redoks, spowodowane nadmierną produkcją reaktywnych form tlenu (ROS). W celu przeżycia w takich warunkach komórki nowotworowe nabyły zdolność wzmocnienia aktywności białek mechanizmów antyoksydacyjnych takich jak enzymy z rodziny tioredoksyn (TXN). Można to zaobserwować zarówno w liniach komórkowych, jak i materiale pierwotnym pochodzącym od chorych na B-ALL. Dodatkowo, wzmożone zaburzenie homeostazy redoks zostało zaobserwowane w podtypie Ph+ B-ALL.

W zakres poznawczy powyższych, aktualnych badań wpisuje się tematyka recenzowanej pracy doktorskiej tj. ocena układu tioredoksyn TXN jako potencjalnego celu terapeutycznego w białaczkach Ph+ oraz zaproponowanie nowej kombinacji leków i przetestowanie jej aktywności cytotoksycznej w badaniach *in vitro* w modelach komórkowych białaczek Ph-pozytywnych. Praca doktorska mgr Łukasza Komorowskiego została wykonana pod kierunkiem Pani Doktor habilitowanej Małgorzaty Firczuk w Zakładzie Immunologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego i została sfinansowana w ramach dwóch projektów: grantu Narodowego Centrum Nauki SONATA BIS 2015/18/E/NZ5/00723, kierowanym przez Panią Dr hab. Małgorzatę Firczuk oraz grantu MNiSW w ramach programu "Regionalna Inicjatywa Doskonałości" (RID), 013/RID/2018/19, którego kierownikiem był Prof. Jakub Gołąb.

Układ rozprawy doktorskiej jest o prawidłowy o strukturze tradycyjnej dla prac doświadczalnych. W poniższej recenzji odniosłem się do jej poszczególnych części (rozdziałów):

Cześć teoretyczna

W rozdziale tym, mgr Łukasz Komorowski w sposób zwięzły, w nawiązaniu do prowadzonych badań, wprowadza czytelnika w zakres tematyczny i cel pracy. W pierwszej części Doktorant omawia strukturę chromosomu Philadelphia oraz aktywność domen funkcjonalnych w obrębie

białka BCR-ABL. Przedstawia izoformy produktu onkogenu z uwzględnieniem roli jaką odgrywa ta onkoproteina w funkcjonowaniu komórek białaczkowych. Następnie Autor dokonuje charakterystyki typów białaczek oraz skupia się na szerszym opisie molekularnym dla wersji Ph⁺ w przypadku ostrej białaczki limfoblastycznej z prekursorów limfocytów typu B (Ph⁺ B-ALL). W rozdziale tym również można zapoznać się z aktualnym stanem wiedzy dotyczącym skuteczności leczenia tego typu białaczek. Część druga wprowadzenia to charakterystyka stresu oksydacyjnego i jego roli w komórkach B-ALL. W tym podrozdziale Doktorant dokładnie opisuje rolę BCL-ABL jaką odgrywa ta kinaza na homeostazę układu redoks. Bardzo istotnym wątkiem poruszonym w tym rozdziale, a istotnym z punktu widzenia całej dysertacji, są mechanizmy protekcyjne komórek nowotworowych skierowane na nagromadzające się w ich strukturach reaktywne formy tlenu (ROS). Opisany został tutaj układ tioredoksyn (TXN), ze szczególnym uwzględnieniem białka PRDX1 oraz jego roli w nabywaniu oporności na leczenie niektórych typów nowotworów. Autor tutaj zaznajamia czytelnika z aktualnym stanem badań dotyczącym możliwości wykorzystania inhibitorów dla składników obrony antyoksydacyjnej tj auranofiny (AUR) czy adenantyny (ADE) stosowanych jako inhibitory TXN. W ostatniej części wprowadzenia mgr Łukasz Komorowski zajął się opisem głównych szlaków naprawy pęknięć dwuniciowych DNA (DSB) tj HRR oraz NHEJ oraz ich roli w komórkach nowotworowych w odpowiedzi na uszkodzenia spowodowane przez stres oksydacyjny. W tym podrozdziale Autor dokładnie opisuje rolę naprawy DSB w komórkach ALL, a także przedstawia możliwości jakie niesie ze sobą zastosowanie nowej generacji inhibitorów białek tego typu naprawy w celu specyficznej eliminacji komórek nowotworowych. Opisana tutaj strategia została wykorzystana w kombinacji w innych cytostatykami w wybranych liniach komórkowych CML i ALL. Do ukoronowania tej części pracy zabrakło mi opisu zjawiska syntetycznej letalności, o które opierają się opisane w tym rozdziale podejścia terapeutyczne. Bardzo bym prosił o przybliżenie tej tematyki podczas publicznej obrony.

Uzasadnienie i Cel pracy

Cel pracy sformułowany jest w sposób klarowny i jednoznaczny. Na zadanie pierwsze mające na celu określenie zahamowania aktywności układu TXN do przelamywania oporności w białaczkach Ph⁺ i ocenę roli PRDX1 w tych nowotworach, jak również zadanie drugie, gdzie celem było opracowanie nowych kombinacji leków w celu poprawy skuteczności terapii Ph⁺ B-ALL, składały się cele szczegółowe.

Szczegółowymi celami tego badania było:

- ocena systemu TXN jako potencjalnego celu w liniach komórkowych białaczki Ph+;
- ocena ekspresji elementów systemu TXN w pierwotnych białaczkach Ph+;
- ocena roli PRDX1 w żywotności komórek Ph+ i ich wrażliwości na inhibitory kinaz tyrozynowych (TKI) i inhibitory NHEJ (NHEJi);
- ocena skuteczności kombinacji TKI i NHEJi w liniach komórkowych Ph+;
- badanie skuteczności TKI i NHEJi w liniach komórkowych Ph+ z niedoborem PRDX1;
- testowanie nowych potrójnych kombinacji obejmujących TKI, AUR i NHEJi w limfoidalnych liniach komórkowych Ph+ i PDX.

Podjęcie realizacji celu rozprawy doktorskiej zostało uzasadnione stosownym odniesieniem do danych literaturowych dotyczących charakterystyki oznaczonych w pracy parametrów/białek i ich potencjalnego związku z rozwojem lub progresją chorób nowotworowych oraz lekoopornością.

Materiały i Metody

Badania naukowe przeprowadzono na siedmiu, zdefiniowanych i prawidłowo dobranych ludzkich liniach komórkowych Ph+, co umożliwiło uprawione wnioskowania na podstawie uzyskanych wyników tj. 4 liniach mieloidalnych (K562, KU-812, LAMA-84, MEG-A2) oraz trzech liniach limfoidalnych (BV173, SUP-B15, TOM-1). Dodatkowo wykorzystane zostały komórki z ludzkiego materiału pierwotnego PDX (pochodzącego od sześciu pacjentów z różnym typem białaczek CML, ALL oraz z różną wrażliwością na TKI) pozyskane jako przeszczep komórek pacjentów z transgenicznego modelu mysiego NSG z upośledzoną odpornością. Doktorant wykorzystał w badaniach zaawansowane metody molekularne tj. CRISPR/Cas9 i systemu wektora lentiwirusowego do wytworzenia genetycznych mutantów PRDX1 ^{-/-} w komórkach BV173 i K562. Do oceny poziomu mRNA wybranych genów zastosowano ilościowy PCR (qPCR), zaś do oceny zmiany profilu ekspresji w analizowanych komórkach wykorzystano technikę RNAseq z użyciem systemu Next Seq 550 system (Illumina). Do oceny żywotności oraz przeżywalności wybranych komórek zastosowano test z barwieniem jodkiem propidyny oraz test klonogenności. W pracy wykorzystano także zestawy

komercyjne w celu określenia poziomu ROS, H2AX, 8-OH-DG oraz DSB. Dobór metod uważam za prawidłowy, a analizę statystyczną za właściwą.

Uwagi dotyczące tego Rozdziału:

- Opisy metod zbyt mało dokładne, w całej pracy zachowany opis tzw. „publikacyjny”, a nie typowy dla rozprawy doktorskiej w formie książki
- Sekcja (strona 42) PDX Ph+ lymphoid cell culture - w mojej opinii powinna być bardziej szczegółowo opisana
- Opis linii komórkowych: brak uszeregowanej informacji do jakich badań wykorzystywano konkretne linie.

Wyniki

Doktorant w usystematyzowany sposób zinterpretował wyniki prac doświadczalnych odnosząc się do kolejnych etapów badań.

Punktem wyjścia w przedstawionych do oceny badaniach było wykazanie zahamowania aktywności układu TXN za pomocą auranofiny (AUR) lub adenantyny (ADE), Inhibicja tego układu spowodowała wzmożoną śmierć limfoidalnych komórek Ph+ oraz uwrażliwiła je na TKIs w przeciwieństwie do komórek mieloidalnych, gdzie nie zaobserwowano takiej zależności. Potwierdzeniem tej obserwacji był zaobserwowany podwyższony poziom ekspresji proksyredoksyny I (PRDX1), elementu układu TXN, zarówno w limfoidalnych liniach komórkowych jak i materiale pierwotnym. Kontynuacją tej hipotezy o znaczeniu tego szlaku w komórkach o origin limfoidalnym było wyciszenie ekspresji PRDX1 za pomocą techniki CRISPR-Cas9. Pozwoliło to na obniżenie żywotności oraz proliferacji, ale tylko komórek limfoidalnych Ph +, dodatkowo uwrażliwiając na TKIs. Dowiedziono tutaj o specyficznej roli PRDX1 dla tego typu białaczek Ph+. Czy Doktorant ma jakąś sugestię odnośnie tej istotnej, powyżej opisanej, obserwowanej różnicy pomiędzy komórkami o pochodzeniu mielo- i limfoidalnym?

Bardzo pomocna w potwierdzeniu postawionej hipotezy okazała się analiza RNAseq, która wykazała, że wyciszenie PRDX1 w limfoidalnych komórkach Ph+ spowodowało zmianę poziomu ekspresji znacznej liczby genów, których produkty uczestniczą w kluczowych procesach komórkowych tj. proliferacja, komórkowe procesy metaboliczne czy apoptoza.

Dowodzi to o roli jaką odgrywa to białko w przeżywalności limfoidalnych komórkach Ph⁺ nawet w niekorzystnych dla tych komórek warunkach.

Właściwa i precyzyjna charakterystyka molekularna komórek nowotworowych pobranych od pacjenta jest kluczowa ze względu na szybkie określenie typu nowotworu, co z kolei ma kolosalne znaczenie w natychmiastowej oraz prawidłowo dobranej strategii i jego skutecznego leczenia. Przykładem może być błędne rozpoznanie Ph⁺ B-ALL zamiast komórek fazy kryzy blastycznej o pochodzeniu mieloidalnym, przekształconym w te o charakterystyce limfoidalnej (LBP).

Wykonana analiza poziomu stresu oksydacyjnego w komórkach limfoidalnych z wyciszonym PRDX1 w porównaniu do funkcjonalnych w to białko komórek. Wykazano brak różnicy w poziomie ROS w komórkach kontrolnych i z wyłączonym genem PRDX1 w obecności IMAT. Wskazuje to na inny mechanizm wrażliwości na IMAT w komórkach PRDX1 -/- niż ten oparty o stres oksydacyjny. Co więcej komórkach limfoidalnych Ph⁺ PRDX1 -/- traktowanych IMAT zaobserwowano zwiększony poziom uszkodzeń DNA oraz podwyższony poziom ekspresji genów NHEJ. Czy istnieje jakaś hipoteza wyjaśniająca to zjawisko wywołane przez IMAT? Komórki Ph⁺ B-ALL okazały się być wrażliwe na zastosowane inhibitory białek NHEJ, a efekt ten nasilał się w obecności inhibitorów TXN. Najistotniejsze, z punktu widzenia klinicznego, zmiany w zmniejszonej przeżywalności komórek linii limfoidalnych jak i tych pierwotnych pochodzących od pacjentów Ph⁺ B-ALL zaobserwowano po zastosowaniu potrójnej kombinacji inhibitorów TKs, układu TXN oraz NHEJ. Wyłączenie sprawnej naprawy DSB w tym typie nowotworów może okazać się kluczowe w przełamaniu ich oporności na tradycyjnie stosowane leczenie.

Jak słusznie zostało napisane w pracy jej ograniczaniem był brak wiedzy na temat charakterystyki funkcjonalności szlaków naprawy DNA w badanych liniach komórkowych, co pozwoliłoby w pełni zinterpretować uzyskane wyniki. Myślę, że w kontynuacji tych ciekawych badań powinien znaleźć się kierunek dotyczący analizy poziomu polimerazy teta, której produkt polimeraza Q wydaje się być aktualnie istotnym elementem pozwalającym komórkom nowotworowym na resztkową naprawę pęknięć nici DNA w sytuacji kiedy upośledzone są główne szlaki naprawcze dla tego typu uszkodzeń. Białko to może odpowiadać na uodpornienie się komórek nowotworowych na zastosowane inhibitory białek naprawy DSB poprzez np. zmianę konstrukcji genetycznej produktów, w które celują związki chemiczne.

Dodatkowe uwagi dotyczące tego Rozdziału:

- Opisy tabel (tytuł tabeli) na górze zamiast na dole – tak się lepiej czyta pracę
- Strona 83 wyniki: 4.5.2. Effects of ROS scavengers on the sensitivity to IMAT – nie opisane w metodach (brak tam jakichkolwiek informacji o zmiataczach)
- W jaki sposób były badane ROS mitochondrialne (mtROS)? Na stronie 78 (ryc. 21) pojawia się taka informacja, natomiast w opisie metody na stronie 48 brak takich informacji. Do określenia mtROS służy np. sonda MitoSOX

Dyskusja i Podsumowanie

W tej części pracy Doktorant odnosi się krytycznie to uzyskanych w ramach pracy wyników badań naukowych, konsekwentnie do poszczególnych jej etapów, w zestawieniu do aktualnych danych literaturowych m in. rozbieżności w badaniach genetycznych i biochemicznych. Świadczy to o jego dojrzałości naukowej. Podsumowanie graficzne części doświadczalnej systematyzuje nową wiedzę wytworzoną w ramach rozprawy i wskazuje na możliwość jej wykorzystania podczas opracowywania nowych strategii terapeutycznych dla analizowanego w rozprawie typu białaczki.

Odnosząc się do całości pracy pod kątem edytorskim i stylistycznym, Doktorant stosuje słownictwo naukowe adekwatnie do omawianych zagadnień, jednak z funkcji recenzenta zwracam uwagę na dostrzeżone w streszczeniu pracy błędne sformułowania, czy skróty myślowe tj. chromosomu kodującego, stres siateczki śródplazmatycznej, czy naprawa DNA przez „scalanie” niehomologicznych końców. W pracy również można dostrzec błędy edytorskie, jednak to nie wpływa na moją ogólną, bardzo pozytywną ocenę recenzowanej pracy doktorskiej.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Łukasza Komoroskiego pt. *Lymphoid-specific role of the thioredoxin system in survival and drug sensitivity of leukemia with BCR-ABL1 translocation* stanowi oryginalne rozwiązanie problem naukowego i spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668). Rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydata w dyscyplinie nauk medycznych oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Wszystkie moje powyżej



przedstawione uwagi dotyczące pracy nie wpływają na moją bardzo wysoką ocenę recenzowanej dysertacji. Wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pana mgr Łukasza Komorowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnoszę do Wysokiej Rady wniosek o wyróżnienie recenzowanej rozprawy doktorskiej ze względu na zastosowane w niej nowatorskiego podejścia do rozwiązywanej w dysertacji kwestii przełamania oporności na leczenie Ph+ B-ALL. Rozwiązanie to oparte zostało o najnowocześniejsze techniki genetyczne i molekularne, wnikliwą analizę rezultatów badań, co może w niedalekiej przyszłości skutkować nowymi, spersonalizowanymi strategiami leczenia tego typu białaczki.

Tomasz Struwno