

Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Katedra Genetyki Klinicznej i Laboratoryjnej
Zakład Genetyki Klinicznej

Łódź, 15.05.2023r

prof. dr hab. med. Maciej Borowiec
Katedra Genetyki Klinicznej i Laboratoryjnej
Zakładu Genetyki Klinicznej
ul. Pomorska 251, A1, 9p
92-213 Łódź
tel: 042 272-57-67
e mail: maciej.borowiec@umed.lodz.pl

Recenzja pracy doktorskiej

pt. „Odkrycie i charakterystyka epigenetycznej funkcji kinaz PIM w rozlanym chłoniaku z dużych komórek B” wykonaną przez mgr **Sonia Maria Dębek** w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii, Zakład Hematologii Eksperymentalnej w Warszawie, promotor dysertacji prof. dr hab. n. med. Przemysław Juszczyński, promotor pomocniczy dr Dorota Komar.

Badania prowadzone w ramach grantu TEAM Fundacji na rzecz Nauki Polskiej POIR.04.04.00-00-5C84/17. Studia doktoranckie realizowane w ramach Narodowego Centrum Badań i Rozwoju POWR.03.02.00-00-I041/16-00.

Rozlany chłoniak z dużych komórek B (DLBCL) jest najczęstszym nowotworem układu limfatycznego u dorosłych, charakteryzującym się dużą heterogenicznością pod względem fenotypu, podłoża molekularnego, rokowania i odpowiedzi na leczenie. Komórki złośliwe znajdują się głównie w narządach limfatycznych, takich jak węzły chłonne i śledzionie, jednak lokalizacje poza węzłowe występują nawet u 30% pacjentów; zaawansowany DLBCL może rozprzestrzeniać się do szpiku kostnego, wątroby, otrzewnej, opłucnej i ośrodkowego układu nerwowego. Objawy kliniczne są niespecyficzne i obejmują powiększone węzły chłonne, niewyjaśnioną utratę masy ciała i gorączkę, nocne poty i podwyższony poziom dehydrogenazy mleczanowej (LDH). Wczesne próby zrozumienia heterogeniczności molekularnej DLBCL i zidentyfikowania podstruktury molekularnej tego nowotworu wykorzystywały analizę transkryptomów DLBCL opartą na mikromacierzy. W badaniu przeprowadzonym przez Alizadeh i wsp. wykazano, że różne DLBCL mają wspólne podobieństwa transkryptomiczne z normalnymi komórkami GC (DLBCL podobne do GCB) lub naiwnymi



komórkami B aktywowanymi anty-IgM / IL-4 / CD40L (DLBCL podobne do ABC) 7. Co ważne, ta klasyfikacja oparta na komórkach pochodzenia (COO) dostarczyła informacji prognostycznych: pacjenci z guzami GCB mają znacznie lepsze rokowanie niż pacjenci z guzami typu ABC. Jednak zgodnie z tendencyjną zasadą klasyfikacji COO, pewna liczba guzów pozostała niesklasyfikowana, co wskazuje, że istniała dodatkowa podstruktura, której nie można uchwycić za pomocą tego podejścia. Aby uzyskać obiektywne, kompleksowe profile transkrypcyjne i podtypy DLBCL, grupa M. Shippa wykorzystwała algorytm klasyfikacji klastrów konsensusu (CCC), znajdując zgodność między 3 niezależnymi metodami grupowania. Zdefiniowano trzy biologicznie odporne, odrębne klastry: „fosforylacja oksydacyjna (Ox-Phos)”, „receptor/proliferaacja komórek B (BCR)” i „odpowiedź gospodarza (HR)”. Co ważne, klasyfikacja CCC była w dużej mierze niezależna od COO.

Chociaż nowe, multiomiczne klasyfikacje nie są szeroko stosowane w klinice, wyczerpująco wyjaśniają zależności onkogenne DLBCL, zapewniając solidne podstawy do zrozumienia patogenezy DLBCL. Ponadto określają możliwe do zastosowania luki, które można wykorzystać do zaprojektowania nowych podejść terapeutycznych. Co ważne, fakt, że najbardziej dominujący podtyp DLBCL wykorzystuje modyfikację chromatyny, z perspektywicznym zastosowaniem terapeutycznym.

Rejestracja nowych terapii, takich jak przeciwciała bispecyficzne, koniugaty przeciwciało-lek (ADC) lub chimeryczne limfocyty T receptora antygeny (CAR-T), przyniosła nową nadzieję pacjentom z DLBCL. Liczne badania kliniczne wykazały bezprecedensowe wskaźniki odpowiedzi na CAR-T u pacjentów z nawracającym i opornym na leczenie (R/R) DLBCL, a terapia CAR-T ostatecznie stała się standardem opieki nad R/R DLBCL. Z drugiej strony, kilka niedawnych analiz rzeczywistych wyników pacjentów pokazuje, że odpowiedź lub całkowity czas przeżycia nie są znacząco lepsze w przypadku terapii CAR-T w porównaniu ze standardowymi schematami, takimi jak allogeniczny przeszczep komórek krwiotwórczych (alloHCT). Dlatego nadal istnieje niezaspokojona potrzeba leczenia DLBCL u pacjentów, którzy nie reagują na terapię, podkreślając znaczenie dalszych podstawowych badań biologii DLBCL, odkrywania leków i badań klinicznych w tych opornych na leczenie kohortach.

Rodzina kinaz PIM składa się z 3 protoonkogennych białek: PIM1, PIM2 i PIM3, ulegających ekspresji w wielu nowotworach, w tym chłoniaku rozlanym z dużych limfocytów B (DLBCL). Kinazy PIM regulują kluczowe procesy komórkowe, takie jak proliferacja, apoptoza, metabolizm i migracja, dlatego ich zahamowanie zyskało zainteresowanie jako potencjalna strategia terapeutyczna. Nad małowzrostowymi inhibitorami pan-PIM prowadzone są badania kliniczne, np. SEL24/MEN1703, który obecnie przechodzi II fazę badania w leczeniu AML. Choć ostatnie badania nieprzerwanie dostarczają nowych danych o



biologicznej roli PIM w nowotworach limfoidalnych, szczegóły i mechanizmy działania onkogenego PIM oraz konsekwencje ich hamowania w DLBCL pozostają niewystarczająco poznane. Ponadto dotychczasowe badania wykazały potencjalną epigenetyczną rolę PIM poprzez fosforylację histonu H3S10, opisaną jednak tylko w pojedynczym *locus*. Genomiczna rola PIM w modulowaniu transkrypcji w komórkach chłoniakowych pozostaje niejasna.

Doktorantka mgr Sonia Dębek w swojej pracy doktorskiej przyjęła za główny cel, opisanie wcześniej niescharakteryzowanej roli kinaz PIM w szerokiej epigenetycznej regulacji ekspresji genów oraz konsekwencji jej hamowania w rozlanym chłoniaku z dużych komórek B, poprzez realizację następujących zadań:

1. opisać zmiany w „krajobrazie” epigenetycznym po zahamowaniu PIM,
2. scharakteryzować zmiany wzorców transkrypcji po zahamowaniu PIM,
3. oraz ocenić wpływ tych zmian na żywotność i proliferację komórek DLBCL.

Miejsce prowadzenia badań, profil badawczy i spektrum problemów z jakimi spotyka się zespół specjalistów w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii, Zakład Hematologii Eksperymentalnej w Warszawie, nie dziwi więc decyzja nad podjęciem wyzwania wysoce ambitnego. W związku z tym, wybór przez Pana Promotora i Doktorantkę tej tematyki badań uważam za bardzo interesujący i w pełni uzasadniony.

Recenzowana praca doktorska jest dysertacją liczącą 114 stron zawierającą 18 rycin, 6 tabel i 207 pozycji literaturowych w większości pochodzących z ostatniego okresu, które posłużyły do przygotowania monograficznej części poglądowej, doświadczałnej oraz dyskusji nad wynikami badań własnych. Dobór pozycji literaturowych nie budzi zastrzeżeń i wskazuje na to, że tematyka badań jest bardzo aktualna.

Pracę rozpoczyna część teoretyczna licząca 19 stron; zawiera 2 ryciny oraz 1 tabelę w pełni przedstawiającą i pozwalającą zrozumieć charakter i skalę trudności tematu. Osobne rozdziały części teoretycznej stanowią zamierzone przejście do obszernego omówienia etiopatogenezy, podłoża fizjologicznego i mechanizmów oporności, regulację poprzez czynniki transkrypcyjne i szlaki sygnałowe, mogące wpływać na potencjalne działanie terapeutyczne kinaz PIM na komórki DLBCL.

Po krótkim wprowadzeniu, dotyczącym patogenezy i potencjalnych terapii komórek DLBCL, Doktorantka omówiła szczegółowo funkcję, regulację oraz możliwości terapeutyczne kinaz PIM, jako elementu potencjalnie zaangażowanego w proces leczenia pacjentów z DLBCL.



Przygotowany przez mgr Sonie Dębek przegląd piśmiennictwa stanowi oryginalnie przemyślany, wyjątkowo interesujący i świetnie zilustrowany wykład na temat zaangażowania kinaz PIM z przedstawieniem mechanizmów przekazywania sygnałowego i efektów ich prawidłowego działania, interakcji epigenetycznych, wpływu na cykl komórkowy, jak też interakcje z potencjalnymi farmaceutykami.

Część doświadczalna pracy obejmuje 77 strony. Poświęcona jest charakterystyce modeli *in vitro* wykorzystywanej w powyższej pracy. Charakterystyce linii komórkowych oraz przybliża skrupulatnie każdy z elementów prowadzenia badań, tj. definiowania inhibitorów, specyfiki komórek wykorzystywanych na poszczególnych etapach projektu, ich przechowywania i przygotowywania, rodzaju bakterii wykorzystywanych w pracy doświadczalnej czy też identyfikacji, ekstrakcji DNA pochodzącego z poszczególnych etapów pracy doświadczalnej.

Przystępując do oceny merytorycznej tej części recenzowanej rozprawy, muszę podkreślić, że prezentowane w niej badania zostały zaplanowane bardzo wszechstronnie, z uwzględnieniem doświadczeń analizujących różne uwarunkowania poszczególnych zagadnień. Oparto je o bardzo nowoczesne techniki eksperymentalne biologii molekularnej i hodowli tkankowej, z licznymi elementami transfekcji i infekcji wirusami proponowanych modeli badawczych.

Jedną z funkcji kinaz PIM jest regulacja TF, takich jak MYC czy NF- κ B. W poprzednich badaniach scharakteryzowano konsekwencje hamowania PIM przez SEL24 / MEN1703 w DLBCL i wykazano, że inhibitor blokował proces transkrypcyjny sterowany przez MYC. Jednak profilowanie ekspresji genów sugerowało, że wpływ PIM na transkrypcję jest szerszy niż wyłącznie poprzez regulacja MYC. Na przykład, hamowanie PIM blokuje wiele kluczowych szlaków chłoniaka, takich jak sygnalizacja receptora Toll-podobnego, przetwarzanie i prezentacja antygeny, cykl komórkowy i przejście fazowe G1-S / G2-M, biosynteza aminoacylo-tRNA i metabolizm pirymidyn, jak również jako transkrypcja zależna od MYC/E2F1 (ryc. 4.1A). Lista szlaków rozregulowanych przez inhibitor PIM przypominała, przynajmniej częściowo, te rozregulowane przez inhibitor BRD4 JQ1 158: z 33 szlaków zmienionych przez JQ1, 8 było również modulowanych przez MEN1703 (ryc. 4.1B). Aby formalnie ocenić te podobieństwa, wybraliśmy 100 najbardziej znacząco obniżonych genów w liniach komórkowych traktowanych inhibitorem PIM i zbadaliśmy ekspresję tego zestawu genów w liniach komórkowych traktowanych JQ1 (ryc. 4.1C). Stwierdzono, że geny z regulacją w dół inhibitora PIM wykazywały zmniejszoną ekspresję również po hamowaniu BRD4. Podsumowując, dane te wskazują,





ze aktywność BRD4 i PIM częściowo się pokrywają. Ponieważ szeroka deregulacja transkrypcji jest często związana ze zmianami epigenetycznymi, Doktorantka odniosła się do dostępnej literatury, aby sprawdzić, czy kinazy PIM mają udokumentowaną funkcję epigenetyczną. W dwóch opublikowanych badaniach opisano mechanizm fosforylacji seryny 10 na histonie 3 (H3S10ph) przez PIM1 w miejscach docelowych MYC w komórkach śródbłonna. Ta aktywacja epigenetyczna obejmowała rekrutację BRD4, co dodatkowo ułatwiło składanie funkcji transkrypcyjnej. BRD4 jest uznanym epigenetycznym regulatorem transkrypcji. Biorąc pod uwagę potencjalną współpracę między PIM1 i BRD4, zbadała, czy hamowanie PIM wpływa na poziomy całkowitego RNA. Zanotowaliśmy powszechny spadek poziomów RNA w porównaniu z komórkami kontrolnymi (ryc. 4.1D), co wskazuje, że kinazy PIM wydają się odgrywać uniwersalną rolę w kontroli biosyntezy i/lub stabilności RNA. Doktorantka, zbadała, czy PIM odgrywa rolę epigenetyczną również w DLBCL. W celu oceny zakresu aktywności PIM we wzorcach epigenetycznych, po 24-godzinnym leczeniu trzema różnymi inhibitorami pan-PIM, które weszły do badań klinicznych, oceniono wybrane poziomy modyfikacji potranslacyjnych histonów: H3S10ph oraz H4K16ac lub H4panAc. Użyliśmy: SEL24/MEN1703, PIM447 oraz inhibitora PIM pierwszej generacji SGI-1776. Wszystkie związki skutecznie zmniejszały poziomy acetylacji H3S10ph i H4 (ryc. 4.2A). Potwierdzono ważną rolę PIM w utrzymaniu zwiększonej ilości H3S10ph. Problem lokalizacji PIM i ich związek z komórkami DLBCL również był w zakresie zainteresowania Doktorantki. W kolejnych etapach badań, potwierdziła ona że PIM1 oddziałuje z chromatyną w komórkach DLBCL. Być może mogłyby też tworzyć kompleksy z innymi białkami epigenetycznymi, ale ta hipoteza wymaga dalszych, kompleksowych badań. Przeprowadzone kolejne serie badań, w niezwykle ciekawy sposób zostały udokumentowane przez Doktorantkę i śmiało mogę stwierdzić że ta część pracy doktorskiej jest niezwykle interesującą „podróżą” w świat oddziaływań cząsteczek PIM na procesy translacji, transkrypcji, proliferacji, oddziaływania na czynniki aktywujące i regulatory wewnątrz komórkowe, potwierdzając niezwykle ważną rolę powyższych w procesach epigenetycznych.

Podsumowując tę część pracy chciałbym podkreślić, że wszystkie użyte metody charakteryzuje wysoki stopień obiektywizacji danych, a wykorzystane analizy statystyczne nie budzą zastrzeżeń. Wszystkie, przeprowadzone doświadczenia zostały zaplanowane i realizowane ze skrupulatnością i obejmuje założone aspekty prowadzonych badań. Sposób ich prezentacji jest przemyślany, co pozwala śledzić postępy pracy i rejestrować realizację jej kolejnych celów i zadań.



W części Dyskusja, Doktorantka przedyskutowała otrzymane wyniki. I w sposób szczegółowy konfrontuje wyniki własne z bogatą literaturą opisując porównawczo poszczególne etapy i mechanizmy interakcji PIM na modyfikacje histonów. Chociaż stale identyfikowane są nowe luki terapeutyczne w DLBCL, heterogeniczność, agresywny charakter i częsty rozwój oporności i / lub nawrotów po leczeniu standardową chemioterapią zwiększają potrzebę nowych, bardziej skutecznych metod leczenia. Kinazy PIM od dawna uważane są za potencjalny cel terapeutyczny w licznych nowotworach litych i hematologicznych. Ulegają nadekspresji w DLBCL, podczas gdy PIM1 jest jednym z najczęściej mutowanych genów w tej chorobie, co sugeruje ważną funkcję w DLBCL. Co ważne, PIM regulują kluczowe onkogeny chłoniaka, w tym MYC, a te dwa białka regulują ich poziomy w mechanizmie sprzężenia zwrotnego. Inne kluczowe i dość scharakteryzowane funkcje onkogenne obejmują: translację białek, transkrypcję, metabolizm komórkowy, cykl komórkowy i apoptozę. Poza tymi kanonicznymi funkcjami, epigenetyczna rola kinaz PIM została zidentyfikowana, ale bardzo słabo scharakteryzowana. Do tej pory epigenetyczna rola PIM została wykazana dla pojedynczego locus. Zatem badanie jego słabo opisanego działania może ujawnić inną patogenną rolę kinaz PIM w DLBCL i zidentyfikować nowe mechanizmy działania inhibitorów PIM, przyczyniając się do projektowania skuteczniejszych terapii DLBCL. Odkrycia przynoszą istotne wnioski dla zrozumienia nie tylko biologii PIM, ale także patogenezy i wrażliwości DLBCL, a także roli H3S10ph w wykonywaniu funkcji komórki i regulacji SE.

Doktorantka, w prowadzonej dyskusji nie chwali się tylko sukcesami ale też identyfikuje słabe punkty pracy, a raczej jej ograniczenia. Wskazuje na brak badania rozkładu chromatyny H3S10ph i PIM1 po hamowaniu PIM w ChIP-Seq, które ostatecznie potwierdziłoby rolę indukowanego przez PIM H3S10ph we wzorcach epigenetycznych wzmacniacza i/lub promotora. Oceny poziomu i rozkładu genomowego H3S10ph w ChIP-Seq była niejednoznaczna, ponieważ jest to wszechobecny znak, który nie tworzy charakterystycznych pików, a ten eksperyment wymaga dalszej optymalizacji. Wskazuje to na dojrzałość Doktorantki, wiarygodność i rzetelność prowadzonych badań. Co w mojej ocenie stawia wartość przeprowadzonych badań na najwyższym miejscu podium.

Wyrazem powyższych są precyzyjne i w pełni zasadne wnioski zaproponowane przez Doktorantkę podsumowujące powyższą pracę. Wnioski te są jednocześnie dowodem na zrealizowanie w pełni przez Doktoranta celów jego dysertacji.





Podsumowując, z pełnym przekonaniem uważam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Soni Dębek pod każdym względem spełnia wymogi stawiane takim dysertacjom. Stanowi ona samodzielne i oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wnosi nowe, ważne poznawczo dane na temat zmiany epigenetyczne towarzyszące hamowaniu PIM, powiązałem je ze zmianami transkrypcyjnymi w chłoniakach DLBCL.

Przygotowana dysertacja została w sposób właściwy, zarówno pod względem merytorycznym, jak i edycyjnym. Drobne uwagi, jakie posiadam do przedstawionej pracy są natury edytorskiej. Doktorantka nie ustrzegła się kilku błędów stylistycznych czy też natury językowej. Kilka tych drobnych uchybień stylistycznych i tzw. literówek, które udało mi się zauważyć nie ma istotnego znaczenia dla jakości i rangi pracy.

Niepodważalne znaczenie dla wartości pracy – którą pod względem merytorycznym oceniam bardzo wysoko, miała by kontynuacja dalszych badań i poznanie procesów identyfikowanych przez Doktorantkę jako uzupełniających i dopełniających całość. Tym bardziej, że niniejsza praca przedstawia nową, epigenetyczną funkcję PIM. W ostatnich latach epigenetyka przyciągnęła uwagę jako siła napędowa karcynogenezy DLBCL. Zatem ukierunkowanie na szlaki epigenetyczne w leczeniu DLBCL jest obiecującym i nowatorskim podejściem. Ponadto Doktorantka udowodniła, że wyczerpanie jednego PIM indukuje kompensacyjną regulację w górę innych PIM, dlatego hamowanie wszystkich trzech PIM powinno być konieczne do osiągnięcia efektu terapeutycznego.

W podsumowaniu uważam, że praca doktorska mgr Soni Dębek zatytułowana „**Odkrycie i charakterystyka epigenetycznej funkcji kinaz PIM w rozlanym chłoniaku z dużych komórek B**” spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.), dla rozprawy na stopień doktora, ze względu na bardzo duży walor aplikacyjny, oraz nowatorski zwracam się z wnioskiem do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Warszawie o dopuszczenie mgr Sonie Marię Dębek do dalszych etapów przewodu doktorskiego. **Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie powyższej pracy doktorskiej stosowną nagrodą, ze względu na zakres prowadzonych badań i ich unikalność w skali problemu, kompleksową analizę badanego obszaru, rzetelność oceny danych, i analiz statystycznych oraz niezaprzeczalnie duży walor aplikacyjny.**

Katedry Genetyki Klinicznej i Laboratoryjnej
Zakładu Genetyki Klinicznej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

prof. dr hab. n. med. Maciej Borowiec

Katedra Genetyki Klinicznej i Laboratoryjnej

92-213 Łódź, ul. Pomorska 251
tel. 42 272 57 67
e-mail: katedra.genetyki@umed.lodz.pl
w4u.umed.lodz.pl/~genetyka

