

Recenzja rozprawy doktorskiej Julii Dudkiewicz-Garbicz pt. „**Inhibicja CDK12/13 jako strategia przełamywania oporności na deksametazon w ostrej białaczce limfoblastycznej**” wykonanej pod opieką prof. dr hab. n. med. Paweł K. Włodarskiego, przedstawionej do obrony przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Przedmiotem rozprawy doktorskiej Pani Julii Dudkiewicz-Garbicz było zbadanie możliwości nasilenia działania deksametazonu w komórkach ostrej białaczki limfoblastycznej poprzez hamowanie aktywności CDK12/13 i dostarczenie mechanistycznych danych dotyczących obserwowanych zjawisk.

Choroby nowotworowe układu krwiotwórczego wciąż stanowią wyzwanie dla współczesnej medycyny. Ostre białaczki limfoblastyczne (ang. Acute lymphoblastic leukemia, ALL) stanowią heterogenną grupę nowotworów atakujących przede wszystkim dzieci. Dostępnych jest wiele schematów leczenia, które początkowo dają dobre rezultaty i które znacznie wydłużyły czas przeżycia pacjentów, jednak problem lekooporności pozostaje jednym z największych wyzwań większości terapii. Stosowanie glikokortykoidów stanowi element większości schematów leczenia, tak więc utrata jego działania terapeutycznego jest dużym problemem klinicznym. Uzasadnia to podejmowanie prób badawczych, mających na celu lepsze poznanie mechanizmów molekularnych ograniczających działanie leków. Oryginalnym rozwiązaniem jest hamowanie aktywności CDK12 i CDK13. CDK12 i CDK13 to kinazy zależne od cykliny E, które między innymi regulują transkrypcję i obróbkę RNA oraz naprawę uszkodzeń DNA. Tym samym odgrywają bardzo ważną rolę w biologii nowotworów.

Praca doktorska przedstawiona mi do oceny powstała przy wykorzystaniu środków finansowych otrzymanych w ramach realizacji mini-grantu (1MN/4/M/MG/N/20) ufundowanego przez Warszawski Uniwersytet Medyczny. Opisane w niej badania były przeprowadzone *in vitro* z użyciem przede wszystkim linii komórkowych B-ALL. W doświadczeniach przetestowano dwa specyficzne inhibitory CDK12/13, których działanie cytotoksyczne wykazywało synergizm *in vitro* z deksametazonem w komórkach B-ALL, a nie T-ALL czy w zdrowych komórkach krwi. Próbę mechanistycznego wytłumaczenia obserwowanych zjawisk podjęto, przeprowadzając analizę transkryptomiczną jednej linii B-ALL, jak i badając wybrane białka zależne od CDK12/13 metodą Western blot. Uzupełnieniem i konsekwencją otrzymanych wyników było sprawdzenie wpływu hamowania CDK12/13 na cykl komórkowy i powstawanie uszkodzeń DNA. Doktorantka wykazała, że modulacja

aktywności CDK12/13 może przywracać działanie cytotoksyczne deksametazonu w komórkach wybranych linii B-ALL, co uzasadnia dalsze badania w tym obszarze

Praca Pani Julii Dudkiewicz-Garbicz jest napisana w języku angielskim i ma konstrukcję typową dla rozpraw doktorskich obejmującą streszczenie w języku polskim i angielskim, listę rycin i tabel, listę zastosowanych skrótów, oraz 5 rozdziałów: wprowadzenie z założeniami i celem pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, konkluzję oraz literaturę (liczącą 182 pozycji literaturowych anglojęzycznych, opublikowanych głównie w ostatnich 15 latach). Streszczenie zamieszczone w języku polskim i angielskim umożliwia zapoznanie się z problematyką i ułatwia zrozumienie wyników pracy.

Praca liczy 121 stron, obejmuje 37 rycin i 9 tabel.. Praca charakteryzuje się precyzyjnym, a zarazem przystępnym językiem. Część teoretyczna oraz opis przeprowadzonych doświadczeń są w pełni zrozumiałe i nie stwarzają trudności w odbiorze. Jest to warte zauważenia, ponieważ praca będzie stanowiła cenne źródło informacji dla czytelników, dla których język angielski nie jest językiem ojczystym i dla których wyszukana frazeologia mogłaby stanowić przeszkodę.

W rozdziale Wprowadzenie, liczącym 20 stron, zawarto informacje niezbędne do zrozumienia przedmiotu rozprawy. W wprowadzeniu przedstawiono informacje dotyczące występowania choroby, rokowania, grup cytogenetycznych, etiologii oraz leczenia. Szczególną uwagę poświęcono białkom CDK12/13 i powstawaniu steroidowej oporności, co pozwala lepiej zrozumieć przedmiot rozprawy doktorskiej i uzasadnia podjęte badania.

Ostre białaczki limfoblastyczne są klasyfikowane przede wszystkim na podstawie komórek, z których powstają. Osiemdziesiąt procent przypadków choroby to ostre białaczki limfoblastyczne z prekursorów komórek B, 15% z prekursorów komórek T i 5% białaczki limfoblastyczne o cechach komórek mieloidalnych, jak i limfoidalnych. Taki rozkład występowania choroby w populacji uzasadnia dobór materiału badawczego. W pracy używano przede wszystkim linii komórkowych ostrej białaczki limfoblastycznej pochodzących z prekursorów komórek B; B-ALL. Białaczki limfoblastyczne są najczęstszymi nowotworami u dzieci. Stanowią około 25% wszystkich nowotworów, a 5-letnie przeżycie wynosi średnio 72% i różni się w zależności od grupy ryzyka. Najmniejsze jest w przypadku wznowy 40%, która dodatkowo cechuje się rozwojem lekooporności. Zasadnym tym samym jest podjęty temat pracy dotyczący przełamывania lekooporności. Etiologia białaczek limfoblastycznych uwzględnia predyspozycje genetyczne, jak i wpływ środowiska. Układ rozdziału Wprowadzenie jest prawidłowy, jednak jego część, zwłaszcza dotycząca CDK12/13 ma cechy dyskusji. Przykładowo, czytając wprowadzenie, dowiadujemy się o efekcie wyciszenia CDK13 w AML (Acute Myeloblastic Leukemia). To są ważne informacje; w dyskusji autorka mogłaby się do nich odnieść w świetle otrzymanych wyników. We wprowadzeniu zabrakło także uzasadnienia zastosowania wybranych inhibitorów CDK12/13. Wybór tych inhibitorów, zdaniem recenzenta, jest prawidłowy, dane literaturowe nie wskazują na ich niespecyficzne działanie. Krótka wzmianka o działaniach i specyficzności badanych substancji byłaby cenną informacją. Rozdział Wprowadzenie jest zakończony listą 6 jasno określonych celów pracy doktorskiej.

Rozdział Materiały i Metody, liczący 8 stron, zawiera informacje, które mogą pozwolić na wykonanie opisanych dalej doświadczeń. Na pochwałę zasługuje tabelaryczne i przejrzyste ujęcie informacji dotyczących zastosowanych linii komórkowych, składu buforów, stężeń przeciwciał. W rozdziale zabrakło pewnych informacji dotyczących warunków przeprowadzanych doświadczeń, liczby powtórzeń oraz metod statystycznych.

Rozdział Wyniki jest najdłuższy i liczy 44 strony. Wyniki rozpoczynają się od analizy bioinformatycznej dotyczącej CDK12/13 i ALL. Przeszukanie dostępnych aplikacji i baz danych jednoznacznie potwierdziło zasadność badania inhibitorów CDK12/13 w celu ograniczenia żywotności komórek B-ALL. CDK12/13 ulegają nasilonej ekspresji w ALL co zostało dodatkowo potwierdzone immunocytochemicznie. Komórki B-ALL są zależne od szlaków sygnałowych regulowanych przez te kinazy. Działanie glikokortykoidów również zależy od badanych kinaz. W kolejnym etapie badań doktorantka przetestowała szereg rozcieńczeń badanych inhibitorów CDK12/13 THZ531 i SR-4835 testem cytotoksyczności MTS. Na uznanie zasługuje zastosowanie aż 14 linii ALL i komórek pochodzących od zdrowych ludzi. Jest to ogromny materiał badawczy i świadczy o zaangażowaniu i determinacji badawczej doktorantki. Na pochwałę zasługuje również przejrzyste ujęcie tabelaryczne wartości IC_{50} pozwalające na szybką analizę wyników bez konieczności doszukiwania się danych na dużej rycinie. Szkoda, że nie ma informacji o liczbie powtórzeń technicznych i badawczych, które były wykonywane, o czym świadczą słupki błędów. Następnie doktorantka sprawdziła, czy stosowane inhibitory CDK12/13 wykazują działanie synergistyczne z deksametazonem. Otrzymane wyniki pozwoliły zweryfikować tę hipotezę. W części linii B-ALL zaobserwowano działanie synergistyczne, komórki nienowotworowe i T-ALL pozostawały odporne. Następnym krokiem w badaniach było wykonanie analizy transkryptomicznej komórek jednej linii traktowanych inhibitorami, i deksametazonem. Otrzymane wyniki wskazały między innymi na modulację szlaków sygnałowych związanych z naprawą DNA, co jest zgodne z danymi literaturowymi, w których hamowanie CDK12/13 jest stosowane w celu nasilenia działania cytotoksycznego czynników uszkadzających DNA. Na uznanie zasługuje przeprowadzenie analizy transkryptomicznej w powtórzeniach biologicznych. Choć podejście to wiąże się ze znacznym wzrostem kosztów badań, stanowi ono niezbędny standard zapewniający wysoką wiarygodność wyników. Dalsza analiza danych wykazała, że inhibicja CDK12/13 wpływa na kształtowanie spliceosomu oraz moduluje ekspresję genów związanych z działaniem deksometazonu. W kolejnym doświadczeniu doktorantka wykazała, że zastosowanie połączenia deksametazonu z inhibitorami CDK12/13 powoduje śmierć i blok w fazie G2 komórek linii SEMK2 inaczej odpornej na działanie glikokortykoidów. Przedstawione wyniki są jednoznaczne, choć zabrakło informacji dotyczącej liczby powtórzeń. Szkoda, że nie przeanalizowano obecności komórek w fazie subG1 cyklu, co dodatkowo mogłoby potwierdzić działanie cytotoksyczne poprzez uszkodzenia DNA. Te wyniki też lepiej pasowałyby jako kolejna rycina po badaniach synergii. Następnym krokiem badań było sprawdzenie ilości białek CDK12/13, CCNK jak i wybranych białek zależnych w panelu linii komórkowych metodą western blot. Na uznanie zasługuje ponowne wykorzystanie szerokiego panelu linii komórkowych. Uzyskane wyniki przedstawiono

w sposób wysoce przejrzysty, a wyciągnięte na ich podstawie wnioski są w pełni uzasadnione i merytorycznie spójne. Zaobserwowanie formy ciętej białka PARP, związanego z uszkodzeniami DNA, uzasadniło ostatnie doświadczenie przedstawione w rozprawie doktorskiej – analizę uszkodzeń DNA metodą ang. Comet Assay. Przedstawione wyniki były zgodne z wcześniejszymi obserwacjami. Hamowanie aktywności CDK12/13 w komórkach linii SEMK2 powodowało uszkodzenia DNA. W przedstawionych wynikach zabrakło analizy integralności DNA w komórkach traktowanych wyłącznie deksametazonem.

Kolejnymi rozdziałami pracy są dyskusja i konkluzje liczące razem 4 strony. Dyskusja stanowi w głównej mierze podsumowanie uzyskanych wyników i w ocenie recenzenta, zyskałaby na wartości po jej głębszej rozbudowie. Ponadto formułowanie uogólnionych wniosków odnoszących się do całego spektrum ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL) wydaje się zbyt daleko idące, zważywszy na fakt, że badania ograniczono do modeli *in vitro*, głównie z wykorzystaniem linii B-ALL.

Ostatnim rozdziałem pracy jest spis literatury obejmujący 182 pozycje. Cytowane prace są właściwe, sformatowane poprawnie, stanowią prawidłowe źródło informacji.

Podsumowanie

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Julii Dudkiewicz-Garbicz rzuca nowe światło na potencjalną rolę hamowania aktywności CDK12/13 w przełamaniu oporności komórek B-ALL na deksametazon *in vitro*. Praca posiada istotny walor poznawczy, a jej rezultaty stanowią cenny punkt wyjścia do dalszych badań nad poznaniem mechanizmów molekularnych leżących u podstaw patogenezy B-ALL. Rozprawę oceniam bardzo dobrze – zaprezentowane wyniki charakteryzują się dużą wartością merytoryczną i posiadają wysoki potencjał publikacyjny. Na uznanie zasługują następujące aspekty:

- Przejrzystość pracy i sposób jej napisania
- Zastosowanie aż 14 linii komórkowych w badaniach wstępnych.
- Szeroki wachlarz użytych metod badawczych
- Drobiazgowa analiza bioinformatyczna

Jednym z obowiązków recenzenta jest też wypunktowanie nieścisłości, a nawet drobnych uchybień. Moje uwagi krytyczne dotyczą następujących kwestii:

- Brak opisu linii CRF-CEM w rozdziale Materiały i metody.
- Rycina 18: wykres dla linii Jurkat nie odpowiada wartości IC_{50} przedstawionej na rycinie 20. Najprawdopodobniej gdzieś na etapie obróbki danych wkraść się błąd
- W rozdziale Materiały i metody część odczynników ma wymienionego producenta, ale nie jest podany numer katalogowy. O ile w przypadku prostych odczynników, takich jak etanol czy DMSO, nie ma to dużego znaczenia, tak w przypadku innych odczynników takich jak np. membrana PVDF czy odczynników złożonych, jak pożywka

hodowlana, jest to już istotne. PVDF jest w kilku rozmiarach 20–40 μm co ma znaczenie dla metody. Pożywki o tej samej nazwie mogą różnić się składem.

- Badania metodą MTS są opisane jako test proliferacji. Metodę MTS można wykorzystać do oceny proliferacji, ale z technicznego punktu widzenia jest to raczej pewien test metaboliczny/badanie żywotności, a nie bezpośredni pomiar syntezy DNA lub podziału komórek.
- Nie podano liczby komórek/zdarzeń analizowanych w cyklu komórkowym.
- Nie podano liczby powtórzeń biologicznych i technicznych w przypadku testów cytotoksyczności/proliferacji. Powtórzenia były robione; wskazują na to słupki błędów, ale nie wiadomo, z jakiej liczby powtórzeń.
- Nie podano informacji dotyczących powiększenia mikroskopowego użytego do wykonania zdjęć przedstawionych na rycinie 12. Określenie „standardowa procedura” bez szczegółów lub odnośnika do literatury jest nieprecyzyjne.
- Informacje dotyczące analizy statystycznej powinny być opisane osobno w rozdziale „Materiały i metody”.
- Czcionka niektórych rycin jest zbyt mała, co sprawia, że są one nieczytelne, np. Rycina 5, 32B.
- Brak cytowania artykułu doktorantki, który był źródłem rycin z rozdziału Wprowadzenie; Ryciny 6-7.
- Plik doktoratu nie został zoptymalizowany do użytku elektronicznego co utrudnia jego dostępność cyfrową
- Część informacji z Wprowadzenia mogłaby znaleźć się w dyskusji.
- Dyskusja jest skromna jak na tak duży materiał badawczy.

Wyniki przedstawione w pracy zachęcają do pytań które chciałbym zadać:

1. Synergia (ZIP score >10) między deksametazonem a inhibitorami była obserwowana w 4 liniach dla SR 4835 i dwóch dla THZ531, co może być czynnikiem mającym na to wpływ? Cytogenetyka? Ekspresja p53?
2. Deksametazon jest związkiem działającym na receptor NR3C1 ale też na receptor mineralokortykoidowy NR3C2. Czy ten drugi receptor był badany? Czy może również wpływać na efekty leczenia w ALL?
3. W analizie transkryptomicznej na drugim miejscu po *FOXO* pojawia się *PAX4*. Jak można interpretować pojawianie się tego genu w kontekście działania inhibitorów CDK12/13 i glukokortykosteroidów?

Wszystkie uwagi krytyczne, pytania czy wątpliwości nie umniejszają wartości merytorycznej pracy doktorskiej.

Stwierdzam, że przedłożona rozprawa doktorska spełnia warunki określone w stosownej ustawie (ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce) i wnoszę o dopuszczenie Pani Julii Dudkiewicz-Garbicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Z uwagi na wysoką wartość poznawczą otrzymanych wyników oraz staranność w opracowaniu i przedstawieniu tak dużego materiału badawczego wnoszę o wyróżnienie przedstawionej pracy doktorskiej.

Patryk Krzemiński