



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.hirszfeld.pl

Wrocław, 2022-07-15

Prof. dr hab. Joanna Wietrzyk
Zakład Onkologii Doświadczalnej
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN
Wrocław

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Łukasza Komorowskiego
pt. *Lymphoid-specific role of the thioredoxin system in survival and drug sensitivity
of leukemia with BCR-ABL1 translocation*
zrealizowanej pod opieką promotora
dr Małgorzaty Firczuk

Głównym zainteresowaniem Doktoranta, a więc i tematem jego rozprawy doktorskiej stały się ostre białaczki limfatyczne z prekursorów limfocytów B (B-ALL), występujące zarówno u dzieci, jak i u dorosłych, a wśród nich, te cechujące się obecnością chromosomu Filadelfia (Ph⁺). Ponieważ ten podtyp B-ALL wiąże się z niekorzystnymi rokowaniami i wysokim ryzykiem nawrotu czy ryzykiem rozwoju oporności na dostępne metody leczenia, poszukiwanie nowych celów terapeutycznych, w tym próby opracowania terapii skojarzonych, są niezwykle istotne.

Rozprawa doktorska napisana została w języku angielskim i zawiera typowe rozdziały dla tego typu opracowania, a więc m.in. streszczenia w obu językach, polskim i angielskim, wstęp, cel badań, metodykę, opis wyników oraz ich dyskusję, no i wnioski, a na końcu, tradycyjnie wykaz najnowszego i bardzo dobrze dobranej piśmiennictwa naukowego.

Wstęp pracy, w mojej opinii, w wyczerpujący sposób wprowadza do zagadnień będących przedmiotem badań Doktoranta. Pomimo szeregu poruszanych zagadnień, jest on spójny i dobrze skonstruowany.

W kolejnym punkcie Autor przedstawił założenia i cel badań. Celem tych badań jest więc ocena przydatności układu tioredoksyn (TXN), jako celu terapeutycznego w Ph⁺ B-ALL wraz z charakterystyką roli peroksyredoksyny 1 (PRDX1) w tych nowotworach oraz opracowanie kombinacji leków, które mogłyby skutecznie zwalczać ten rodzaj białaczki. Autor wymienia także 6 szczegółowych celów swoich badań. Z pewnością tak przedstawiony cel badań można uznać za bardzo ambitny.

Autor w swoich badaniach wykorzystał 7 linii komórkowych oraz materiał biologiczny pochodzący od pacjentów. Przeprowadził także badania na zwierzętach z wykorzystaniem ksenoprzeszczepu komórek pochodzących od pacjentów (PDX), na które uzyskał odpowiednie pozwolenia (załączone na końcu pracy). Autor wykonał cały szereg badań z użyciem nowoczesnych technik biologii molekularnej. Wszystkie metody zostały



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości: IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.hirszfeld.pl

raczej szczegółowo przedstawione i wyczerpująco opisane. Wyjątkiem jest opis badania na zwierzętach, z którego trudno zorientować się dokładnie po jakim czasie od zaszczepienia ludzkich komórek rozpoczęto leczenie i jak długo ono trwało. O czasie trwania leczenia, 72h, dowiadujemy się z opisu wyników – rozumiem, że leki podano jednorazowo? Jaką drogą je podano? Nie do końca też rozumiem w jaki sposób przedstawiono wyniki tych badań – czy jest to liczba żywych ludzkich komórek CD19⁺ oceniona po sortowaniu komórek mysiej śledziona? Inne pytanie dotyczące metodyki badań: czy gen kontrolny *RPL29* został dobrany eksperymentalnie spośród jakiejś puli genów kontrolnych?

Omawianie wyników Autor rozpoczyna od analizy baz zdanych pod kątem ekspresji wybranych genów, których ekspresja ulega zmianom w Ph⁺ B-ALL. Te analizy stanowiły dodatkową motywację do podjętych badań i pozwoliły na wybór układu TNX i jego składowych, jako głównego celu badań. W szczególności skierowały Autora do poszukiwania odpowiedzi na pytanie, na ile łączne zastosowanie inhibitorów kinazy tyrozynowej (TKI) z inhibitorami układu TXN może być skuteczne? Autor dowodzi, z użyciem 2 linii komórkowych B-ALL, że badane substancje wykazują silny synergizm w hamowaniu żywotności limfoidalnych komórek Ph⁺. Co ciekawe, synergizm ten nie występuje w liniach mieloidalnych.

Dalej Autor ocenił poziom PRDX1 i TXN1 w szeregu linii komórkowych i wśród pacjentów, stwierdzając, że ekspresja PRDX1 jest istotnie wyższa w komórkach mieloidalnych, zaś TXN1 i TXN-R1 w komórkach limfoidalnych. Knock-out PRDX1 w komórkach limfoidalnych BV173 znacznie obniża ich żywotność i zwiększa ich wrażliwość na imatinib i dasatinib, co nie ma miejsca lub jest znacznie mniej intensywne w przypadku komórek mieloidalnych K569.

Dalsze badania Autor prowadził z wykorzystaniem komórek BV173 z nokautem PRDX1, analizując ekspresję szeregu białek po traktowaniu imatinibem. W tej części badań brakuje mi analizy denzytometrycznej membran, zwłaszcza w tych przypadkach, gdzie różnice pomiędzy grupami nie są bardzo wyraźne. Następnie Doktorant ocenił ekspresję transkryptomu w w/w komórkach traktowanych imatinibem. Opisał geny i szlaki sygnałowe, załączając ich krótką charakterystykę, które uległy zmianie w samych komórkach z nokautem PRDX1, a także w tych komórkach traktowanych imatinibem. Na podstawie wyników tych badań, autor w dalszej części pracy postanowił ocenić parametry stresu oksydacyjnego i stres siateczki endoplazmatycznej (ER) stwierdzając, że nie mają one prawdopodobnie istotnego znaczenia w działaniu imatinibu na komórki z nokautem PRDX1.

Kontynuując badania nad rolą PRDX1 w Ph⁺ B-ALL, autor wykonał rekonstytucję PRDX1 typu dzikiego oraz kilku mutantów punktowych w komórkach BV173 z nokautem PRDX1. Potwierdził rolę PRDX1 w osłabianiu wrażliwości komórek na imatinib.

Kolejne badania również zostały motywowane wynikami badań RNRseq, a mianowicie zbadanie roli PRDX1 w utrzymaniu integralności DNA. Autor dowiódł, że knock-out PRDX1 w komórkach BV173 prowadzi do kumulacji uszkodzeń DNA, nawet przy zwiększonej



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.hirszfeld.pl

ekspresji genów naprawy uszkodzeń DNA. To dało podstawę do kolejnej hipotezy, a mianowicie, że komórki pozbawione PRDX1 mogą być bardziej wrażliwe na zahamowanie naprawy DNA. Dla zbadania tej hipotezy Autor wykorzystał znane inhibitory naprawy DNA udowadniając większą wrażliwość komórek limfoidalnych, ale nie mieloidalnych bez PRDX1 na te czynniki. To wszystko skłoniło autora do przeprowadzenia badań *in vitro* i *in vivo* z wykorzystaniem PDX nad możliwością zastosowania potrójnej kombinacji leków do zwalczania Ph⁺ B-ALL, a mianowicie inhibitora TXN, inhibitora kinazy tyrozynowej oraz inhibitora naprawy DNA, uzyskując obiecujące dane.

Dyskusja zwięźle podsumowuje i konfrontuje z danymi z literatury uzyskane wyniki. Ponadto, autor zarówno w trakcie dyskusji, jak i opisując wyniki, krytycznie odnosi się do swoich osiągnięć, podkreślając wady, czy niedoskonałości niektórych z zastosowanych technik, a także konieczność przeprowadzenia dalszych badań, np. dotyczących opisanego mechanizmu działania potrójnej kombinacji w komórkach limfoidalnych Ph⁺, czy potrzebę szerszych badań na zwierzętach. Podkreśla to dojrzałość naukową doktoranta. Pewne elementy dyskusji mgr Łukasz Komorowski umieścił już w opisie wyników, zwłaszcza tych, dotyczących badań RNAseq. To w tej części, powołując się na dane literaturowe, opisał rolę najważniejszych genów, których ekspresja uległa zmianie w badanych komórkach. Takie podejście nawet mi się podoba, gdyż pozwoliło w dyskusji skupić się na zagadnieniach bezpośrednio związanych z prowadzonymi badaniami.

Autor prawidłowo wnioskuje w opracowanych 6 wnioskach, które dobrze podsumowują wykonane badania i wskazują na pełną realizację założonych celów badań.

Podczas czytania tej niezwykle interesującej rozprawy nasunęły mi się następujące pytania (poza wspomnianymi dotyczącymi metod badawczych). Czy Autor zastanawiał się nad tym, aby kompozycję leków w badaniu *in vivo* dobrać tak, aby zachować takie proporcje ich stężeń, które najlepiej sprawdzały się w badaniach *in vitro*? Jaka była toksyczność zbadanych kombinacji leków dla zwierząt?

Podsumowując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Łukasza Komorowskiego jest bardzo cennym opracowaniem, które oprócz istotnego poszerzenia wiedzy podstawowej, zawiera cenne dane z punktu widzenia aplikacyjnego. Autor zastosował szereg nowoczesnych technik badawczych (w tym nowoczesne techniki biologii molekularnej, a także badania na zwierzętach z wykorzystaniem ksenoprzeszczepu komórek nowotworowych pochodzących od pacjentów), które wykorzystał do przeprowadzenia spójnego, logicznego ciągu badań, uzyskując wartościowe dane. Ponadto praca zilustrowana jest czytelnymi wykresami, a także ilustracjami pokazującymi przebieg eksperymentów, czy zagadnienia opisywane we wstępie i dyskusji. Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Łukasza Komorowskiego świadczy o szerokiej wiedzy teoretycznej Doktoranta w zakresie tematyki badawczej będącej przedmiotem rozprawy oraz potwierdza umiejętność sprawnego wykorzystania tej wiedzy w przygotowaniu informacji wstępnych i do



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.hirszfeld.pl

przeprowadzenia dyskusji własnych wyników. Autor zaprezentował oryginalne rozwiązanie problemu naukowego opisujące nowe specyficzne cele terapeutyczne do leczenia Ph⁺ B-ALL. Wszystko to świadczy o nabyciu przez Doktoranta umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, a moje drobne uwagi zamieszczone w recenzji nie mają wpływu na całościową bardzo wysoką ocenę Doktoranta i jego pracy. Ponadto, Mgr Łukasz Komorowski jest współautorem 2 publikacji, w tym pierwszym autorem pracy przeglądowej związanej z prowadzonymi w ramach rozprawy doktorskiej badaniami.

W związku z powyższym uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Łukasza Komorowskiego pt. *„Lymphoid-specific role of the thioredoxin system in survival and drug sensitivity of leukemia with BCR-ABL1 translocation”* spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668), a dorobek naukowy kandydata uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk medycznych. Tym samym zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Łukasza Komorowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wskazując na wysoką wartość merytoryczną i aplikacyjną uzyskanych wyników oraz aktywność publikacyjną Doktoranta składam wniosek o wyróżnienie rozprawy.

Prof. dr hab. Joanna Wietrzyk