



Gdańsk, 3 maja 2023

Zakład Enzymologii i Onkologii Molekularnej
Gdański Uniwersytet Medyczny
ul. Dębinki 1
80-210 Gdańsk
tel. 58 349 15 85
rafal.sadej@gumed.edu.pl

**Recenzja pracy doktorskiej lek. Dawida Mehlicha zatytułowanej:
„Poszukiwanie racjonalnych strategii przełamывania chemiooporności potrójnie
ujemnego raka piersi – kinaza MLK4 jako nowy cel terapeutyczny”**

Rak piersi jest chorobą wysoce heterogenną o różnej patogenezie i podłożu molekularnym. Jego poszczególne podtypy mają odmienne zachowania kliniczne oraz schematy terapii a w konsekwencji różne rokowanie. Niewątpliwym przełomem w leczeniu tej choroby okazały się terapie celowane. Powszechnie uważa się, że tzw. potrójnie ujemny rak (TNBC) piersi charakteryzuje się najgorszą prognozą. Związane to jest zarówno z jego cechami kliniczno-patologicznymi jak i ograniczoną liczbą dostępnych terapii celowanych. Standardowe leczenie TNBC obejmuje m.in. chemioterapię. W jej przypadku, istotnym problemem jest występująca pierwotna i nabyta oporność na stosowany lek, czego konsekwencją jest wznowa choroby. Stąd też poszukiwanie efektywnych punktów uchwytu podnoszących efektywność chemioterapii i hamujących progresję TNBC jest jednym z wyzwań współczesnej onkologii molekularnej.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana Dawida Mehlicha dotyczy kinaz białkowych (ze szczególnym uwzględnieniem MLK4) i ich inhibitorów w kontekście leczenia potrójnie-ujemnego raka piersi. Praca wykonana została w Laboratorium Medycyny Doświadczalnej Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego oraz Laboratorium Molekularnej OnkoSygnalizacji Międzynarodowego Instytutu Mechanizmów i Maszyn Molekularnych Polskiej Akademii Nauk pod opieką prof. dr hab. Dominiki Nowis i dr Anny Marusiak.

Recenzowana rozprawa obejmuje spójny tematycznie cykl publikacji - jednej o charakterze przeglądowym (Mehlich et al., *Cancer Letters* 2022) i jednej eksperymentalnej (Mehlich et al., *Cell Death and Disease* 2021). W opracowaniu zawarto informacje o nazwach i numerach projektów badawczych (w tym dwa granty otrzymane przez Doktoranta) z których finansowano badania, wykaz stosowanych skrótów, streszczenie całości pracy w języku polskim i angielskim a także zwięzły wstęp uzasadniający połączenie wskazanych publikacji w jeden cykl oraz przedstawiający osiągnięcie naukowe kandydata na tle dotychczasowego stanu wiedzy. Wyodrębniono również założenia, cele nadrzędne i cele szczegółowe obu publikacji. Następnie załączono obie publikacje oraz zwięzłe je podsumowano. Na końcu opracowania znajduje się spis literatury oraz oświadczenia współautorów prac o ich udziale w powstaniu manuskryptów. Opisany układ rozprawy jest standardowy i nie budzi żadnych uwag. Pan Dawid Mehlich jest pierwszym autorem w obu publikacjach a Jego zadeklarowany wkład to odpowiednio 80% w powstanie publikacji pierwszej i 51% w drugiej. Prace liczą odpowiednio 2 i 14 autorów. Oczywistym jest więc, że udział Autora w powstanie tego cyklu był wiodący.

Pierwsza z prac (Mehlich et al., *Cancer Letters* 2022) ma charakter przeglądowy i skupia się na zagadnieniu zastosowania inhibitorów kinaz w terapii potrójnie ujemnego raka piersi. Po wstępie charakteryzującym chorobę i obecne schematy leczenia autorzy skupiają się na opisie heterogenności TNBC. Następnie kolejno opisane są inhibitory PI3K/Akt/mTOR, MAPK, receptorowych kinaz tyrozynowych, kinaz zależnych od cyklin oraz odpowiedzi na uszkodzenia DNA w świetle wyników ich zastosowania w badaniach klinicznych obejmujących pacjentki z TNBC. Pracę zamyka sekcja prezentująca dalsze perspektywy strategii celujących w aktywność kinaz w leczeniu TNBC. Publikacja reprezentuje bardzo wysoki poziom naukowy. Wąski zakres terapii celowanych dostępnych w przypadku TNBC jest istotnym problemem klinicznym. Temat ten jest aktualny o czym świadczy liczba zakończonych/trwających badań klinicznych obejmujących ten podtyp raka piersi. Całość opracowania jest niezwykle wnikliwa. Oczywisty jest olbrzymi nakład pracy Autorów włożony w przeanalizowanie dostępnej literatury, w tym wyników zakończonych badań klinicznych. W mojej opinii jest to najlepsze opublikowane opracowanie dotyczące przeglądu i efektywności inhibitorów kinaz w terapii TNBC.

Druga z publikacji (Mehlich et al., *Cell Death and Disease* 2021) stanowi kontynuację tematyki dotyczącej roli kinaz w rozwoju i leczeniu raka piersi. Jest to klasyczna praca eksperymentalna, w której skupiono się na analizach udziału MLK4 w regulacji powstawania uszkodzeń DNA i promocji oporności komórek TNBC na chemioterapeutyki. W publikacji wykazano m.in., że wyciszenie ekspresji MLK4 oraz zastosowanie inhibitora jej aktywności

uwrażliwiają komórki TNBC na działanie doksorubicyny i etopozyny (indukcja apoptozy, spadek żywotności komórek). Zaobserwowano również, że *knock-down* MLK4 potęguje hamujące działanie doksorubicyny na wzrost guza w modelu mysim. Udokumentowano, że utrata ekspresji MLK4 prowadzi do akumulacji uszkodzeń DNA w komórkach TNBC eksponowanych na chemioterapeutyki. Dogłębne analizy mechanizmu molekularnego aktywności MLK4 w obecności doksorubicyny wskazały na udział MLK4 w fosforylacji ATM, tj. kinazy będącej jednym z głównych regulatorów maszynery naprawczej uszkodzeń DNA w komórce. Dodatkowo wyniki pracy sugerują, że MLK4 prawdopodobnie zaangażowana jest w proces naprawy DNA poprzez niehomologiczne łączenie końców. Dzięki sekwencjonowaniu RNA dowiedziono, że MLK4 jest zaangażowana w indukowaną uszkodzeniami DNA ekspresję cytokin NF- κ B-zależnych (np. IL-6, IL-8, CXCL1, CXCL6), co promuje przetrwanie komórek TNBC w obecności chemioterapeutyków. Uzupełnieniem badań była analiza danych klinicznych kohorty pacjentek z ER-ujemnym rakiem piersi poddanych leczeniu antracyklinami, która wskazała na powiązanie wysokiej ekspresji mRNA dla MLK4 z gorszym przeżyciem chorych. Uważam, że praca ta jest na bardzo wysokim poziomie. Obejmuje ona ogrom świetnie zaplanowanych eksperymentów. Jakości badań dowodzi przykładowo ilość zastosowanych doświadczeń kontrolnych. Przykładowo specyfikę obserwowanych efektów względem MLK weryfikowano poprzez wyciszenie jej ekspresji, delecję kodującego genu, jak również zastosowanie nadekspresji MLK4 w formie „dzikiej” i nieaktywnej. Dodatkowo kluczowe wyniki eksperymentów *in vitro*, zostały zweryfikowane w modelu mysim i w analizach klinicznych. Publikacja ta stanowi logiczną całość, jest znaczącym osiągnięciem naukowym i świadczy o znakomitym warsztacie badawczym nie tylko Doktoranta ale i całego zespołu.

Mam parę pytań do całości opracowania:

- i) czy istnieje możliwość, że kinazy okazałyby się lepszym celem terapii TNBC niż receptory dla czynników wzrostu, czynniki transkrypcyjne czy fosfatazy?
- ii) czy za faktem nie do końca satysfakcjonujących wyników badań klinicznych dotyczących zastosowania inhibitorów kinaz w TNBC stoi jedynie wysoka heterogenność choroby? Czy bardziej precyzyjny dobór pacjentek rozwiązałby ten problem?
- iii) proszę o odniesienie się efektu zaangażowania MLK4 w naprawę uszkodzeń DNA w świetle podwyższonej częstotliwości mutacji BRCA1/2 u pacjentów z TNBC, fenotypu BRCAness oraz zastosowania inhibitorów PARP w terapii TNBC. Jaka grupa i jaki schemat terapii byłby najbardziej efektywny w kontekście potencjalnej terapii anty-MLK4?

iv) w jaki sposób dobieralibyśmy pacjentów do ewentualnego leczenia anty-MLK4? Na podstawie ekspresji białka, genu, jego amplifikacji? Czy wiadomo coś na temat mutacji MLK4? Prosiłbym o ustosunkowanie się do powyższych pytań w trakcie publicznej obrony pracy doktorskiej.

Podsumowując, chciałbym podkreślić, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska przygotowana jest nadzwyczaj starannie. Manuskrypt napisany jest w zasadzie bezbłędnie, język jest fachowy i zrozumiały. Wszystkie zagadnienia, mimo że opisane stosunkowo zwięźle, dostarczają niezbędnych informacji do zrozumienia całości pracy. Postawione cele są bardzo ambitne. Zaplanowanie eksperymentów jest na najwyższym poziomie, otrzymane wyniki są świetnie udokumentowane a praca całościowo stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego. Aktualność tematyki, spójność zagadnienia oraz lekkość z jaką Autor prowadzi czytelnika przez swój projekt doktorski i otrzymane wyniki sprawiła, że lektura pracy była dla mnie dużą przyjemnością. Wydaje mi się, że najlepiej o jakości wyników i całego projektu świadczą publikacje będące meritum opracowania. Znajdują się one w czasopiśmie powszechnie uważanych za prestiżowe. Z własnego doświadczenia wiem jak trudno jest opublikować prace z obszaru onkologii doświadczalnej w wiodących w tej dziedzinie magazynach.

Moja ocena przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej lek. Dawida Mehlicha zatytułowanej „Poszukiwanie racjonalnych strategii przełamania chemiooporności potrójnie ujemnego raka piersi – kinaza MLK4 jako nowy cel terapeutyczny” jest jednoznacznie pozytywna, a rozprawa spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 ze zm.). Wnoszę więc o dopuszczenie przez Radę Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego Pana Dawida Mehlicha do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Równocześnie biorąc pod uwagę jakość otrzymanych wyników, bardzo wysoką wartość merytoryczną rozprawy udokumentowaną prestiżowymi publikacjami wchodzącymi w jej skład oraz wiodący udział Autora w ich powstaniu, zwracam się do wysokiej Rady o wyróżnienie ocenianej pracy stosowną nagrodą.

dr hab. Rafał Sądej, prof. GUMed