

prof. dr hab. med. Tomasz Urański
Klinika Pediatrii i Hemato-Onkologii Dziecięcej
Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie
ul. Unii Lubelskiej 1
71-252 Szczecin

Ocena

rozprawy doktorskiej Pani lek. Julii Dudkiewicz-Garbicz
pt. „Inhibicja CDK12/13 jako strategia przełamania oporności na deksametazon
w ostrej białaczce limfoblastycznej”.

(tytuł angielski:

„Targeting CDK12/13 to Overcome Glucocorticoid Resistance in Acute Lymphoblastic
Leukemia”)

Od czasu badań Pearsona i Eliela (Cancer, 1949) wskazujących, że zastosowanie ACTH lub kortyzolu w leczeniu ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL) znacząco redukuje liczbę komórek białaczkowych glikokortykoidy są jednym z filarów wszystkich programów leczenia ALL tak u dorosłych, jak i u dzieci. Syntetyczne glikokortykoidy (prednison lub deksametazon) są stosowane przede wszystkim w leczeniu indukującym i konsolidującym remisję, a odpowiedź wstępna na leczenie tymi preparatami przez wiele lat uważana była za czynnik o znaczeniu rokowniczym (Riehm H, i wsp. Klin. Padiatr, 1987). Skuteczniejszym lekiem przeciwbiałaczkowym, w tym w przeciwieństwie do prednisonu penetrującym w obszar ośrodkowego układu nerwowego jest deksametazon, jednak jego stosowanie wiąże się z nasilonymi objawami ubocznymi (wyższy odsetek zagrażających życiu zakażeń bakteryjnych i grzybiczych), stąd w „europejskich” programach leczenia, w przeciwieństwie do „amerykańskich” to prednison jest „frontmanem” leczenia ALL.

Oporność na glikokortykoidy obserwuje się u 8-15% dzieci z ALL, u dorosłych odsetek ten wynosi nawet 20-40%, co świadczy, że jest to istotny problem kliniczny, a odkrycie metod przełamania oporności komórek ALL na glikokortykoidy miałoby znaczący wpływ na poprawę wyników leczenia.

Mechanizm działania glikokortykoidów w leczeniu ALL wydaje się być dobrze poznany; po biernym wnikięciu do komórki leki te wiążą się z kodowanym przez gen NR3C1 receptorem dla glikokortykoidów (GR), który transportuje je do jądra komórek białaczkowych. W jądrze kompleks lek-receptor działa jak czynnik transkrypcyjny łącząc się ze specyficznymi fragmentami DNA, co aktywuje geny hamujące proliferację i indukujące apoptozę. Coraz więcej wiadomo także o mechanizmach oporności na glikokortykoidy. Za zjawisko to mogą odpowiadać m. in. mutacje genu NR3C1, aktywacja szlaków przeżycia komórek białaczkowych (np. szlak PI3K/AKT), nadaktywność enzymów metabolizujących glikokortykoidy (np. cytochromu CYP3A4 z rodziny P450) czy też obniżona aktywność odpowiedzialnych za indukcję apoptozy kaspaz. Istotną rolę wydaje się też odgrywać dysregulacja kinaz zależnych od cyklin: CDK12 i CDK13, które odgrywają ważną rolę w regulacji transkrypcji poprzez wpływ na fosforylację polimerazy RNA. Wyniki badań sugerują, że mogą one wpływać na stabilność i funkcję GR, wspierać aktywację szlaków przeżycia komórek białaczkowych i hamować apoptozę poprzez regulację ekspresji genów pro- i anty-apoptotycznych. W świetle tych informacji logiczną wydaje się być hipoteza, że hamowanie aktywności CDK12 i CDK13 może skutkować przełamaniem oporności na glikokortykoidy. Tą hipotezę postanowiła w swoich badaniach zweryfikować Doktorantka, a wyniki tych badań przedstawiła w przedłożonej mi do oceny rozprawie doktorskiej. Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym przyjęła do wiadomości informację na temat badania pt. „Inhibitor kinazy zależnej od cyklin 12 i 13 jako nowy potencjalny lek w ostrej białaczce limfoblastycznej” uznając, że przedstawione badanie nie stanowi eksperymentu medycznego w rozumieniu art. 21 ust. 1 ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty i nie wymaga uzyskania zgody Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym.

Rozprawa napisana jest w języku angielskim, w układzie typowym dla rozprawy doktorskiej. Liczy 122 strony numerowane, zawiera 9 tabel i 27 rycin.

W rozdziale „Wstęp” Doktorantka skrótowo omówiła klasyfikację morfologiczną i immunologiczną ALL, objawy kliniczne i laboratoryjne oraz diagnostykę tej choroby. Zdecydowanie więcej uwagi poświęciła zmianom genetyczno-molekularnym w ALL, by końcową część rozdziału poświęcić zjawisku lekooporności, w szczególności oporności na glikokortykoidy. Omawiając ten problem skupiła się głównie na roli CDK12 i CDK12 tak

fizjologicznej, jak i w patogenezie chorób nowotworowych. Ta część „Wstępu” doskonale uzasadnia cel podjętych przez Doktorantkę badań.

Doktorantka wyznaczyła aż 6 celów:

1. Scharakteryzowanie ekspresji genów CDK12, CDK13 oraz cykliny K w prawidłowych liniach hematopoetycznych oraz w odrębnych molekularnie podtypach ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL) z wykorzystaniem ogólnodostępnych zbiorów danych transkryptomicznych.
2. Ocena zależności genetycznej komórek ALL od kompleksu CDK12/CDK13 na podstawie publicznie dostępnych baz danych CRISPR oraz określenie związku tej zależności z wrażliwością na glikokortykosteroidy w celu zidentyfikowania genetycznych podstaw terapii skojarzonej.
3. Ocena cytotoksyczności oraz potencjalnej selektywności hamowania CDK12/CDK13 w ALL poprzez badania na liniach komórkowych B-ALL i T-ALL, a także komórek hematopoetycznych pochodzących od zdrowych dawców szpiku, z wykorzystaniem selektywnych inhibitorów kinaz zależnych od CDK12/13.
4. Określenie czy inhibitory CDK12/CDK13 wykazują synergistyczne działanie z glikokortykosteroidami poprzez przeprowadzenie badań „terapii” skojarzonej oraz ocenę uzyskanych efektów z zastosowaniem ilościowych modeli synergii.
5. Scharakteryzowanie programów transkrypcyjnych leżących u podstaw interakcji pomiędzy glikokortykosteroidami a inhibitorami CDK12/CDK13 poprzez przeprowadzenie sekwencjonowania RNA (RNA-seq) w celu identyfikacji różnic w ekspresji genów oraz zmian w aktywności szlaków molekularnych indukowanych przez „leczenie” pojedynczymi lekami oraz ich kombinacją.
6. Zbadanie dalszych komórkowych i molekularnych konsekwencji hamowania CDK12/CDK13, zarówno w monoterapii, jak i w skojarzeniu z glikokortykosteroidami, poprzez ocenę apoptozy, dynamiki cyklu komórkowego oraz walidację metodą Western blot ekspresji kluczowych markerów białkowych.

Cele te układają się w logiczny ciąg, co doskonale ilustruje plan badania przedstawiony w formie graficznej na ryc. 8 (str. 60 manuskryptu).

Doktorantka wykazała znakomite opanowanie nowoczesnego warsztatu badawczego, a metody realizacji badania dobrała w sposób właściwy. Badanie przeprowadziła *in silico* i *in*

vitro. W etapie *in silico*, poszukując uzasadnienia tematu badań wykorzystano bazę danych transkryptomicznych i proteomicznych (BloodSpot 3.0) i bazę danych zgromadzonych metodą CRISP/Cas-9 w portalu DepMap.

Materiał do badań *in vitro* stanowiły pozyskane ze źródeł komercyjnych linie komórek ostrej białaczki limfoblastycznej (11 linii B-ALL i 2 linie T-ALL) oraz jednojądrzaste komórki hematopoetyczne pobierane z krwi obwodowej 4 zdrowych dawców, a także komórki białaczkowe i trepanobiopaty szpiku chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną.

Komórki do badań pobierano z założonych hodowli linii komórkowych (uzyskanych z wiarygodnego źródła komercyjnego), zaś w przypadku komórek pobieranych od dawców i pacjentów – bezpośrednio po procedurze izolacji. Badane komórki inkubowano przez 72 godz. w różnych kombinacjach z badanymi substancjami: deksametazonem i inhibitorami CDK12 i CDK 13: SR3835 i THZ531, a następnie oceniano przeżycie komórek w teście z jodkiem propydyiny (w cytometrii przepływowej), aktywność proliferacyjną w teście MTS i apoptozę badanych komórek w teście z aneksyną V (w cytometrii przepływowej) i metodą oceny przełamania łańcucha DNA (ang. DNA strand breaks) w elektroforezie komórek na żelu agarowym (Comet assay). Rozmieszczenie komórek w fazach cyklu komórkowego badano w cytometrii przepływowej po barwieniu DNA komórek odczynnikami Hoechst 34580. Stężenia badanych białek oznaczano ilościowo metodą BCA, a następnie identyfikowano je przeprowadzając elektroforezę na żelu poliakrylamidowym i metodą Western blotting. Badane białka oznaczano także w trepanobiopatach szpiku kostnego metodą immunocytochemiczną. W ostatnim etapie badania Doktorantka ekstrahowała i sekwencjonowała RNA badanych komórek oceniając w ten sposób zmiany ekspresję genów w komórkach badanych przed i po inkubacji z deksametazonem i/lub inhibitorami CDK12 i CDK13.

Rozdział „Results” jest najobszerniejszą częścią rozprawy, liczy bowiem 43 strony, a szczegółowe ich omówienie wykraczałoby daleko poza ramy niniejszej oceny. Wyniki badań przedstawione zostały w formie opisowej i graficznej. Wyniki analiz *in silico* potwierdziły słuszność hipotezy badawczej. Analizując dane z bazy BloodSpot 3.0 Doktorantka wykazała, że nadekspresja genów CDK12, CDK13 i CCNK jest zjawiskiem występującym w niektórych podtypach genetycznych ostrej białaczki limfoblastycznej, a nieobserwowanym w

prawidłowych komórkach hematopoetycznych. Potwierdzenie tej obserwacji znalazła we własnych badaniach immunocytochemicznych trepanobiopsatów szpiku kostnego stwierdzając wyraźną ekspresję białka CDK13 oraz zmienne w intensywności występowanie białek CDK12/13 i CCNK w białaczkach B-komórkowej i brak ekspresji badanych białek w komórkach zdrowych dawców. Analiza danych z portalu DeepMap pozwoliła na ustalenie, że kompleks CDK12, CDK13 i CCNK jest niezbędny do przeżycia i proliferacji w komórkach białaczek B- i T komórkowych. Poszukując dalej, przeanalizowała dane opublikowane przez Poularda i wsp. I doszła do wniosku, że genem wydającym się odgrywać najistotniejszą rolę w modulowaniu odpowiedzi komórek białaczkowych linii NALM6 jest gen *CDK13*.

W badaniach *in vitro* Doktorantka obserwowała heterogenność odpowiedzi na inkubację z deksametazonem: w większości linii białaczek B-komórkowych stwierdzała wrażliwość na glikokortykoidy, zaś w pozostałych, a także w komórkach szpiku pacjentów z białaczką częściową bądź całkowitą oporność na deksametazon. Dodanie jednego z inhibitorów CDK12/13 skutkowało nasileniem obserwowanej cytotoksyczności, nawet w liniach komórkowych pierwotnie opornych na deksametazon co na poziomie komórkowym objawiało się nasileniem apoptozy komórek białaczkowych, zwiększeniem uszkodzeń DNA (DNA strand breaks) oraz zmianami w profilu faz cyklu komórkowego. W ocenie Autorki wskazuje to na synergizm działania deksametazonu i inhibitorów CDK12/13 w komórkach ALL; zjawiska tego nie obserwowała w identycznie badanych komórkach hematopoetycznych pobranych od zdrowych dawców. Sekwencjonowanie RNA wykazało zmiany ekspresji 7099 genów po inkubacji z SR4835 i 4259 genów po inkubacji z THZ531, a szczegółowa analiza GSEA pozwoliła na stwierdzenie, że inhibicja CDK12/13 uruchamia program transkrypcyjny w komórkach B-ALL, który skutkuje tłumieniem procesów biosyntetycznych i mitochondrialnych, aktywacją szlaków odpowiedzi na stres i zaburzenia przetwarzania RNA. (alternative splicing). Wydaje się też, że inhibicja CDK12/13 w komórkach ALL wzmacnia program transkrypcyjny typowy dla odpowiedzi na deksametazon, co może potwierdzać i tłumaczyć obserwowaną synergię kombinacji deksametazonu i inhibitorów CDK12/13.

Najkrótszym rozdziałem rozprawy jest rozdział „Discussion”. Doktorantka podzieliła go na pięć sekcji tematycznych układających się w logiczną narrację podsumowującą wyniki własnych badań, konfrontując je z danymi literaturowymi. Słusznie przyjmuje, że badania te wskazują

na zwiększoną ekspresję kompleksu CDK12/13/CCKN w ALL B-komórkowej i że kompleks ten powinien stać się celem terapeutycznym, bowiem jego inhibicja skutkuje cytotoksycznością w różnych liniach komórkowych ALL, przełamując odporność na glikokortykoidy. Podkreśla znaczenie obserwowanego synergizmu deksametazonu i inhibitorów kompleksu CDK12/13/CCKN i znaczenie braku tego efektu w prawidłowych komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej, widząc w tym potencjał terapeutyczny. Opierając się na wynikach własnych badań zjawisko to tłumaczy obserwowanymi zmianami ekspresji genów hamujących programy wzrostu komórek, lecz także genów regulujących transkrypcję zależną od receptora dla glikokortykoidów. Twierdzi także, że inhibicja kompleksu CDK12/13/CCKN prowadzi do zahamowania szlaków naprawy DNA i w konsekwencji do zatrzymania komórek w fazie G2 cyklu komórkowego z następową ich apoptozą.

Rozdział „References” obejmuje 182 pozycje, z których 49 opublikowanych zostało w roku 2020 lub w latach następnych. W moim przekonaniu świadczy to o aktualności tematu badawczego.

Tezy formułowane przez Doktorantkę brzmią „w pierwszym czytaniu” dość stanowczo, ale Autorka doskonale zdaje sobie sprawę z ograniczeń siły tychże, czemu dała wyraz w ostatniej sekcji rozdziału „Limitations and future directions”. Wynikają one z faktu, iż trzon badanego materiału stanowiły linie komórkowe, zaś pozostałe komórki pochodziły od raptem dwóch pacjentów o niezdefiniowanej immunologicznie i genetycznie chorobie. Zgadzam się z Autorką, że potrzebne są dalsze badania przybliżające rzeczywistość kliniczną, a dopiero ich wyniki mogą wyznaczać kierunek badań przedklinicznych i klinicznych. To niestety daleka droga.

Rozprawę doktorską lek. Julii Dudkiewicz-Garbic oceniam niezwykle wysoko. Doktorantka precyzyjnie sformułowała hipotezę badawczą uzasadniając ją wynikami własnych badań *in silico* i danymi z piśmiennictwa, precyzyjnie sformułowała cele, zaprojektowała ciąg eksperymentów tworzących logiczny i spójny ciąg, zrealizowała je korzystając z najnowocześniejszego warsztatu badawczego, prawidłowo zinterpretowała wyniki i wyciągnęła z nich prawidłowe wnioski (imponuje mi umiejętność integrowania wyników badań prowadzonych różnymi technikami), wskazując kierunki dalszych badań. Jako klinicysta, z niecierpliwością oczekuję informacji czy i w jaki sposób można będzie

bezpiecznie przełamać oporność na glikokortykoidy u dzieci z ALL, zwiększając w ten sposób szanse na ich wyleczenie.

Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na pewne niedociągnięcia w redakcji manuskryptu:

1. W rozdziale „Materials” brakuje szczegółowej informacji o pacjentach, jak i o zdrowych dawcach, od których pobrano materiał do badań. Rozpoznanie pacjentów „primary ALL” są zbyt ogólne, brakuje informacji o immunofenotypie ALL i o charakterystyce genetycznej (obie informacje ważne w kontekście rozprawy). Nie znalazłem też w tym rozdziale żadnej informacji o pochodzeniu trepanobiopsatów szpiku, które były przedmiotem badań.
2. Nie znalazłem w manuskrypcie bardziej szczegółowej informacji o stosowanych w badaniu inhibitorach CDK12/13 (SR3835 i THZ531) poza wzmianką, że są to „małe cząsteczki”. Uważam, że warto odesłać czytelnika do publikacji współautorstwa Doktorantki (Dudkiewicz-Garbicz J, Włodarski PK. CDK12 and CDK13 in oncology: from RNA regulation to therapeutic targeting. *Cell Oncol* . 2026; 49(1):13.) tym bardziej, że jedna z rycin ilustrujących manuskrypt pochodzi właśnie z tej publikacji.
3. Sugeruję usunięcie słowa „Epidemiology” z tytułu podrozdziału 1.1, bowiem nie zawiera on praktycznie żadnych informacji o epidemiologii ostrych białaczek, w szczególności ALL.
4. Sugeruję też wprowadzenie w planowanych publikacjach rozdziału „Podsumowanie wyników; „Results summary”. W przedłożonej mi do oceny rozprawie funkcję tę pełni w pewnym stopniu rozdział „Discussion”, ale chciałbym, by wyniki przedstawiono w oddzielnym rozdziale w bardziej syntetycznej formie. Lektura manuskryptu jest trudna, jest on napisany językiem na wskroś profesjonalnym, a klinicyści, którzy powinni także zapoznać się z wynikami badań przedstawionymi w rozprawie język ten może okazać się niezrozumiałym.

Powyższe uwagi w jakikolwiek sposób nie zmieniają mojej niezwykle wysokiej oceny rozprawy doktorskiej lek. Julii Dudkiewicz-Garbicz. Rozprawa doktorska Pani lek. Julii Dudkiewicz-Garbicz spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668). Z pełnym przekonaniem o

wysokich walorach poznawczych rozprawy przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie Pani lek. Julii Dudkiewicz-Garbicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz publicznej obrony pracy doktorskiej. Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie rozprawy w zgodności z zasadami przyjętymi przez Wysoką Radę, sugerując ocenę *Summa cum laudae*. Uzasadnienie - jak w treści opinii.

Szczecin, 17 lipca 2026 r.

prof. dr hab. n. med. Tomasz Urański
specjalista chorób dziecięcych
specjalista onkolog i hematolog dziecięcy