



UNIwersYTET
WARSAWski

Wydział Biologii
Instytut Genetyki i Biotechnologii



dr hab. Tomasz Wilanowski
Instytut Genetyki i Biotechnologii
Wydział Biologii
Uniwersytet Warszawski

prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Marta Struga
wiceprzewodnicząca Rady Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawski Uniwersytet Medyczny

Warszawa, 2.09.2022

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR ŁUKASZA KOMOROWSKIEGO

Szanowna Pani Przewodnicząca, Wysoka Rado,

Przedstawiam recenzję rozprawy doktorskiej pana mgr Łukasza Komorowskiego, zatytułowanej „LYMPHOID-SPECIFIC ROLE OF THE THIOREDOXIN SYSTEM IN SURVIVAL AND DRUG SENSITIVITY OF LEUKEMIA WITH BCR-ABL1 TRANSLOCATION”. Pracę wykonano w Zakładzie Immunologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Promotorem pracy jest pani dr hab. Małgorzata Firczuk.

Rozprawa składa się z sześciu rozdziałów, wykazu cytowanego piśmiennictwa, listy figur i tabel oraz wykazu skrótów. Ponadto załączono opinię komisji bioetycznej i zgodę komisji etycznej. Po wprowadzeniu Autor we wstępie opisuje procesy istotne dla dalszego ciągu jego rozprawy: powstawanie i znaczenie chromosomu Filadelfia, związane z nim typy białaczek, znaczenie stresu oksydacyjnego oraz mechanizmów naprawy DNA. Godny pochwały jest fakt, że autor opisuje we wstępie wyłącznie procesy istotne dla interpretacji wyników jego badań naukowych, bez zbędnych „wycieczek” na tematy niepowiązane z jego badaniami. Cele pracy są sformułowane jasno i zwięźle. Nie jestem natomiast przekonany, czy opis metod jest wystarczająco szczegółowy dla powtórzenia tych eksperymentów przez specjalistów w tej dziedzinie nauki, na przykład, opis generowania komórek PDX z myszy jest lakoniczny (str. 40-41). Autor nie wyjaśnił w jakich warunkach przeprowadzano ich wirowanie, jakie było pochodzenie kulek magnetycznych i jak przebiegała procedura oczyszczania komórek PDX z ich użyciem itp. W tym miejscu oczekiwałbym przynajmniej odsyłacza do literatury lub do szczegółowego protokołu laboratoryjnego a najlepiej by było, gdyby Autor opisał wszystkie swoje procedury eksperymentalne wystarczająco skrupulatnie, żeby można było powtórzyć jego doświadczenia bez potrzeby sięgania do dodatkowych źródeł.

Badania naukowe zostały przeprowadzone według logicznego planu. Autor wykorzystał publicznie dostępne zbiory danych do przeprowadzenia meta-analizy zmian ekspresji genów wywołanych przez indukcję BCR-ABL1. Na podstawie jej wyników Autor postawił hipotezę, że system tioredoksyny może mieć znaczenie w rozwoju białaczek limfoidalnych powiązanych z chromosomem Filadelfia. Następnie przy użyciu inhibitorów tego systemu Autor wykazał, że

rzeczywiście system tioredoksyny jest istotny dla przeżycia takich komórek oraz dla ich reakcji na inhibitory BCR-ABL1. Jednak jego znaczenie dla białaczek mieloidalnych powiązanych z chromosomem Filadelfia okazało się mniejsze. Potem Autor wyciszył ekspresję peroksyredoksyny 1 (PRDX1) w wybranych liniach komórkowych, które poddał rozmaitym analizom. Ich zwieńczeniem było zastosowanie potrójnych kombinacji inhibitorów BCR-ABL1, systemu tioredoksyny oraz systemów naprawy pęknięć w DNA przez niehomologiczne łączenie końców (systemu kanonicznego i alternatywnego) w różnych liniach komórkowych oraz w komórkach PDX.

Wyniki zostały przedstawione w sposób bardzo przejrzysty, przy pomocy figur, wykresów, diagramów i tabel. Szczególnie podobała mi się konsekwencja w zastosowaniu kolorów: na zielono wyniki dla komórek kontrolnych, na czerwono dla komórek z wyłączonym genem *PRDX1* (figury 10-30). To bardzo mi ułatwiło śledzenie toku rozumowania Autora. Nie mam żadnych zastrzeżeń do interpretacji wyników przez Autora ani do jego konkluzji.

Rozprawa jest napisana w języku angielskim i niestety, znalazło się w niej wiele błędów i niepoprawności dotyczących języka. W tekstach oficjalnych nie należy skracać „it is” do „it's” (str. 30 i 32), „was not” do „wasn't” (str. 33), „they are” do „they're”, „did not” do „didn't” (str. 34) i w innych podobnych przypadkach. Błędy ortograficzne zauważone przeze mnie to na przykład „DBS” na str. 34 i 38 (powinno być „DSB”), „seeked” zamiast „sought” (str. 24 i 103), „defiecent” zamiast „deficient” (str. 103). Inne błędy językowe to „no in-depth research comparing BCR-ABL1 isoforms signaling **wasn't** conducted until 2017” (powinno być „no in-depth research comparing BCR-ABL1 isoforms signaling **was** conducted until 2017”, str. 17), „cNHEJ-related proteins' expression wasn't consistently downregulated CML cells” (powinno być „cNHEJ-related proteins' expression **was not** consistently downregulated in CML cells”; str. 33), „evaluation of PRDX1's role of in viability” (tutaj drugie „of” jest niepotrzebne, str. 39), „in the presence of presence” (str. 42). Autor ma tendencję do nadużywania strony biernej, na przykład „LIG4 is also considered to be downregulated”, „cNHEJ was discovered to be overactivated” (oba przykłady ze str. 33). Zdarzała się także niekonsekwencja dotycząca liczby pojedynczej i mnogiej, na przykład „a potential anticancer drug targets” (str. 38), „this changes” zamiast „these changes” (str. 105). Błąd językowy znalazł się również w polskojęzycznej części rozprawy. PRDX1 to po polsku peroksyredoksyna 1 a nie proksyredoksyna 1, jak napisano na str. 14. Autor nie objaśnił także niektórych skrótów, na przykład EC₂₀ i EC₅₀ (str. 52), NOD i NSG (str. 40) czy PDX (ten skrót pojawia się w tekście 67 razy, ale nigdzie nie jest on objaśniony, nie ma go też w wykazie skrótów).

Podczas obrony proszę Autora o ustosunkowanie się do następujących kwestii:

- W figurze 1 (str. 27) struktura $\overset{|}{\text{SH}}-\overset{|}{\text{SH}}$ jest nieprawidłowa; właściwy zapis to $\overset{|}{\text{SH}} \quad \overset{|}{\text{SH}}$.
- Czy różnice w poziomach ekspresji w figurze 19A (str. 76) są istotne statystycznie? To samo pytanie dotyczy figury 28 (str. 87).
- W figurach 21 i 22 (str. 78 i 79) w legendach znajduje się stwierdzenie „non-significant comparisons are not shown on the graph”, natomiast w tekście dotyczącym tych figur Autor napisał „no statistically significant differences were found”. Wygląda mi to na sprzeczność. Jeżeli nie wykryto statystycznie istotnych różnic, to te figury powinny być puste, skoro „non-significant comparisons are not shown on the graph”.

W prezentowanej rozprawie imponuje mi wysoki poziom trudności technicznych wielu eksperymentów. Na przykład samo utrzymanie przy życiu myszy NSG jest wielkim wyzwaniem dla wielu zwierzętarń, a przecież były one niezbędne dla wygenerowania komórek PDX. To samo

dotyczy systemu CRISPR-Cas9, który w praktyce dużo częściej nie działa niż działa, oraz kilku innych przypadków. Nakład pracy jest naprawdę ogromny. Autor skromnie prześlizguje się nad swoimi wynikami ale przecież każdy diagram słupkowy na stronach 53-102 wymagał wielokrotnie powtórzonych pomiarów, przy różnych stężeniach badanych związków chemicznych, oraz nierzadko różnych czasach inkubacji. Jednak dzięki temu uzyskane wyniki mają niebagatelną wartość naukową oraz potencjalnie duże znaczenie dla przyszłej praktyki klinicznej. Za szczególnie ważne uważam wyniki zaprezentowane na stronach 99-102 gdyż uzyskano je na komórkach ludzkich pochodzących od pacjentów, chociaż „podhodowanych” w myszach NSG (komórki PDX).

Najciekawsze – moim zdaniem – wyniki dotyczą działania potrójnych kombinacji inhibitorów BCR-ABL1, systemu tioredoksyny oraz systemów naprawy pęknięć w DNA przez niehomologiczne łączenie końców (systemu kanonicznego i alternatywnego). Takie kombinacje wywołują silne efekty cytotoksyczne na komórki białaczki, również na komórki PDX. Oczywiście zgadzam się z Autorem, że potrzebne są teraz szczegółowe analizy mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za te obserwacje. Mnie jednak dużo ważniejsze – i pilniejsze – wydają się badania wpływu tych kombinacji na zdrowe białe ciała krwi i na zdrowe organizmy, na przykład na modelach zwierzęcych. Jest bowiem całkiem możliwe, że Autor właśnie opracował nowe metody leczenia niektórych białaczek, i jest wskazane, aby te metody wprowadzić do praktyki klinicznej. W dyskusji Autor bardzo nieśmiało wspomina o potencjalnych praktycznych zastosowaniach swoich wyników – dlaczego? Może należało tam ambitniej napisać o zastosowaniach klinicznych? I już teraz rozpoczynać rozmowy z klinicystami? Proszę Autora o ustosunkowanie się do tej kwestii podczas obrony.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668). Powyższe stwierdzenie upoważnia mnie do przedstawienia wysokiej Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosku o dopuszczenie pana mgr Łukasza Komorowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie występuję do wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej pana mgr Łukasza Komorowskiego. Najważniejsze przesłanki do przedstawienia takiego wniosku to wysoki poziom naukowy zaprezentowanych badań przy znacznych wyzwaniach technicznych a także potencjalne zastosowania kliniczne przedstawionych wyników.

Z wyrazami szacunku

Tomasz Wilanowski