

Zakład Hematoonkologii Doświadczalnej
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Lublin 20-090
ul. Chodzki 1
tel./fax. +48 81448 6630
Kierownik:
Prof. dr hab. Krzysztof Giannopoulos



Experimental Hematooncology
Department
Medical University
of Lublin
20-090 Lublin, POLAND
1 Chodzki St.
tel./fax. +48 81448 6630
Head:
Prof. Krzysztof Giannopoulos

Lublin 17.04.2024

OCENA

ROZPRAWY NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH

Lek. Piotra Kuliga

**pt. " Epigenetyczne aspekty mechanizmu działania bortezomibu, mechanizmów
rozwoju lekooporności oraz implikacje kliniczne dla rozwoju potencjalnych
terapii adjuwantowych"**

Bortezomib jest inhibitorem proteasomów stosowanym w leczeniu szpiczaka plazmocytoego, najczęściej w połączeniu z innymi lekami, takimi jak daratumumab, lenalidomid lub talidomid. Duża skuteczność zahamowania proteasomów w szpiczaku plazmocytowym wiąże się z znacznym obrotem białkowym związanym z nadprodukcją monoklonalnych immunoglobulin, co prowadzi do akumulacji białek w nowotworowych plazmocytach, to zaś indukuje zaprogramowaną śmierć komórki (apoptozę).

Zmiany epigenetyczne odgrywają rolę w rozwoju i postępie szpiczaka plazmocytoego, co może wskazywać na nowy obszar terapeutyczny. Zbadano kilka terapii epigenetycznych u chorych na szpiczaka plazmocytoego. Inhibitory deacetylazy histonów (HDAC) działają poprzez blokowanie aktywności deacetylaz histonów, enzymów usuwających grupy acetylowe z białek histonów, co prowadzi do bardziej skondensowanej struktury chromatyny i zmniejszenia ekspresji genów. W badaniach klinicznych dotyczących szpiczaka plazmocytoego badano leki takie jak vorinostat i panobinostat. Ten ostatni był łączony z bortezomibem. Inne terapie to min.: inhibitory metylotransferazy DNA, inhibitory bromodomeny i domeny pozaterminalnej (BET) oraz inhibitory metylotransferazy histonowej. Poza panobinostatem żadne leczenie epigenetyczne nie zostało zarejestrowane. Panobinostat w połączeniu z bortezomibem i deksametazonem okazał się dość toksyczny i ze względu na rozwój innych bardziej skutecznych i lepiej tolerowanych terapii jest rzadko stosowany w praktyce klinicznej.

Zakład Hematoonkologii Doświadczalnej
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Lublin 20-090
ul. Chodzki 1
tel./fax. +48 81448 6630
Kierownik:
Prof. dr hab. Krzysztof Giannopoulos



Experimental Hematooncology
Department
Medical University
of Lublin
20-090 Lublin, POLAND
1 Chodzki St.
tel./fax. +48 81448 6630
Head:
Prof. Krzysztof Giannopoulos

Co ciekawe, wykazano, że bortezomib, oprócz swojego głównego mechanizmu działania, wywiera działanie epigenetyczne. Badania sugerują, że bortezomib może indukować zmiany w ekspresji genów poprzez mechanizmy epigenetyczne. W szczególności stwierdzono, że bortezomib wpływa na acetylację histonów i metylację DNA, czyli dwie kluczowe modyfikacje epigenetyczne regulujące ekspresję genów. Wywołane przez bortezomib zmiany we wzorcach metylacji DNA mogą prowadzić do zmiany ekspresji genów zaangażowanych w progresję nowotworu i oporność na leki. Tak więc epigenetyczne efekty bortezomibu mogą przyczynić się do jego działania przeciwnowotworowego poprzez wpływ na ekspresję genów kluczowych dla przeżycia i proliferacji komórek szpiczaka plazmocytoowego. W charakterystykę epigenetycznych aspektów mechanizmu działania bortezomibu, mechanizmów rozwoju lekooporności oraz idących za tym implikacji klinicznych wpisuje się przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska.

Celem pracy było poszerzenie wiedzy na temat epigenetycznych aspektów mechanizmu działania bortezomibu na komórki szpiczaka, zdefiniowanie, zależnych od modyfikacji epigenetycznych, mechanizmów rozwoju lekooporności na bortezomib, poszukiwanie potencjalnych związków zwiększających skuteczność bortezomibu w terapii szpiczaka plazmocytoowego.

Przedstawiona do recenzji rozprawa jest cyklem publikacji składającym się z trzech spójnych tematycznie artykułów naukowych, w tym jednej pracy poglądowej (Publikacja 1) oraz dwóch prac oryginalnych (Publikacje 2 i 3). W jednej publikacji doktorant jest pierwszym autorem (Publikacja 1), natomiast w dwóch pozostałych publikacjach, równorzędnym, pierwszym autorem (Publikacje 2 i 3).

1. Kulig, P.; Łuczowska, K.; Bakinowska, E.; Baumert, B.; Machaliński, B. Epigenetic Alterations as Vital Aspects of Bortezomib Molecular Action. *Cancers* 2024, 16, 84.

2. Łuczowska, K.*; Kulig, P.*; Rusińska, K.; Baumert, B.; Machaliński, B. 5-Aza-2'-Deoxycytidine Alters the Methylation Profile of Bortezomib-Resistant U266 Multiple Myeloma Cells and Affects Their Proliferative Potential. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 16780.

Zakład Hematoonkologii Doświadczalnej
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Lublin 20-090
ul. Chodzki 1
tel./fax. +48 81448 6630
Kierownik:
Prof. dr hab. Krzysztof Giannopoulos



Experimental Hematooncology
Department
Medical University
of Lublin
20-090 Lublin, POLAND
1 Chodzki St.
tel./fax. +48 81448 6630
Head:
Prof. Krzysztof Giannopoulos

3. Łuczowska, K.*; Kulig, P.*; Baumert, B.; Machaliński, B. Vitamin D and K Supplementation Is Associated with Changes in the Methylation Profile of U266-Multiple Myeloma Cells, Influencing the Proliferative Potential and Resistance to Bortezomib. *Nutrients* 2024, 16, 142.

Sumaryczny współczynnik Impact Factor prac przedstawionych w ramach cyklu publikacji wynosi 16,7 (sumaryczna liczba punktów Ministerstwa Edukacji i Nauki: 480).

Pierwsza praca z cyklu jest artykułem poglądowym podsumowującym aktualne prace oryginalne dotyczące epigenetycznych aspektów mechanizmu działania bortezomibu, rozwoju oporności na bortezomib oraz metod ich przewycięzania.

Do najważniejszych wyników prac oryginalnych można zaliczyć wykazanie różnic w metylacji po inkubacji komórek linii U266 bortezomibem lub inhibitorem metylacji. Określono zmiany metylacji w genach FBXW7 oraz ORAI3 mogą wpływać na rozwój oporności na bortezomib. Analiza GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) pozwoliła na zidentyfikowanie 20 istotnych statystycznie ścieżek przekazywania sygnału, których geny wykazywały obniżony poziom metylacji w komórkach traktowanych bortezomibem i inhibitorem metylacji w porównaniu z komórkami hodowanymi z samym bortezomibem. Dotyczą one splicingu RNA, deacetylacji białek, regulacji modyfikacji histonów i deacetylacji histonów, które są istotne przy rozwoju oporności na inhibitory proteasomów. Z istotnych obserwacji wykazano hipometylację genów FBXL6, CLRN3 i PMP2 w komórkach opornych na bortezomib w porównaniu z komórkami kontrolnymi.

Ciekawa jest analiza wpływu witaminy D3 oraz witaminy K na redukcję proliferacji komórek szpiczakowych. Co więcej w komórkach wrażliwych na bortezomib obie witaminy wykazywały działanie synergistyczne z inhibitorem proteasomów, a w hodowli komórek MM U266 opornych na bortezomib dodanie witamin do medium hodowlanego skutkowało zmniejszeniem proliferacji w porównaniu do kontrolnych komórek szpiczaka plazmocytoowego

W analizie wpływu witamin D3 oraz K zidentyfikowano 36 miejsc hipometylowanych i 769 miejsc hipermetyleowanych. Do najistotniejszych zmian w trakcie inkubacji jedynie z witaminą D

Zakład Hematoonkologii Doświadczalnej
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Lublin 20-090
ul. Chodzki 1
tel./fax. +48 81448 6630
Kierownik:
Prof. dr hab. Krzysztof Giannopoulos



Experimental Hematooncology
Department
Medical University
of Lublin
20-090 Lublin, POLAND
1 Chodzki St.
tel./fax. +48 81448 6630
Head:
Prof. Krzysztof Giannopoulos

zaliczono hipometylację genów *CLEC12B* i *BAMBI*, które odpowiadają za hamowanie proliferacji komórek nowotworowych. Zaobserwowano również wzrost poziomu metylacji genów *NTN1* i *MYH10* związanych z progresją nowotworów

Wyniki analiz poddano walidacji za pomocą techniki qRT-PCR, wykazując modulację ekspresji genów *ARHGAP26*, *MYH10*, *PMP2*, *RFX8*, *BAMBI*, *CLEC12b* przez metylację. W odniesieniu do wpływu badanych witamin na wrażliwą na bortezomib linię szpiczaka U266, istotną obserwacją jest niemal 60% spadek ekspresji genu *MYH10* i jednocześnie 73% wzrost ekspresji genu *CLEC12b*. Dodatkowo, po trzykrotnej ekspozycji na witaminy zaobserwowano 70% wzrost ekspresji genu *RFX8* w porównaniu z komórkami kontrolnymi.

Na podstawie uzyskanych wyników i przeprowadzenia dyskusji Doktorant sformułował 5 wniosków:

1. Modyfikacje epigenetyczne, takie jak zmiany w profilu metylacji, ncRNA oraz modyfikacje histonów, są istotnym aspektem mechanizmu działania bortezomibu.
2. Cytotoksyczne właściwości cząsteczki bortezomibu są przede wszystkim związane z globalnym spadkiem metylacji w komórkach nowotworowych ekspozowanych na lek. Jednocześnie, rozwój oporność na bortezomib jest również związana ze zmianami w metylomie.
3. Zastosowanie inhibitorów metylacji, zwłaszcza AZA, w terapii MM ma podstawy patofizjologiczne. Po pierwsze, ze względu na działanie synergistyczne z bortezomibu, AZA może stać się składową schematów leczenia opartych o bortezomib. Po drugie, AZA ma potencjał do resensytyzacji opornych komórek MM na bortezomib oraz wykazuje działanie cytotoksyczne względem opornych klonów, co czyni ją potencjalnym kandydatem do zastosowania w kolejnych liniach leczenia.
4. Witaminy D3 oraz K ze względu na swoje plejotropowe działania związane z modulacją układu immunologicznego oraz wpływ na epigenetykę, mogą być wkrótce rutynowo wykorzystywane w ramach tzw. terapii adjuwantowej.

Zakład Hematoonkologii Doświadczalnej
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Lublin 20-090
ul. Chodzki 1
tel./fax. +48 81448 6630
Kierownik:
Prof. dr hab. Krzysztof Giannopoulos



Experimental Hematooncology
Department
Medical University
of Lublin
20-090 Lublin, POLAND
1 Chodzki St.
tel./fax. +48 81448 6630
Head:
Prof. Krzysztof Giannopoulos

5. Powyższe, obiecujące spostrzeżenia wymagają dalszej weryfikacji na alternatywnych liniach komórkowych MM oraz finalnie w modelu badania klinicznego.

Podsumowując pracę oceniam wysoko, metodologia jest nowoczesna, a wyniki zostały opublikowane w recenzowanych międzynarodowych czasopismach mających impact factor. Bezsporny jest wiodący udział Doktoranta w powstawaniu tych prac. Warto podkreślić, że uzyskane wyniki mogą mieć znaczenie praktyczne. Nie mam uwag merytorycznych.

Uważam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce t.j. Dz.U. 2023 poz. 742. Praca jest nowatorska, a uzyskane wyniki mogą mieć istotne znaczenie kliniczne. Wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie o dopuszczenie lek. Piotra Kuliga do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz wyróżnienie pracy.

Prof. dr hab. Krzysztof Giannopoulos