

ul. Strzeszyńska 32
60-479 Poznań

tel. +48/61/657 91 00
fax +48/61/823 32 35
e-mail: igcz@man.poznan.pl

www.igcz.poznan.pl

Prof. dr hab. Maciej Giefling
Zastępca dyrektora ds. naukowych
Kierownik Zakładu Genetyki Nowotworów

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Sonii Marii Dębek pt.

**„Discovery and Characterisation of the Epigenetic Function of PIM
Kinases in Diffuse Large B-Cell Lymphoma”**

Celem przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej jest określenie roli kinaz tyrozynowych PIM w epigenetycznej regulacji ekspresji genów i ich znaczenia w proliferacji i żywotności komórek nowotworowych w chłoniaku rozlanym z dużych limfocytów B (*ang. DLBCL*). Cel ten doktorantka realizowała poprzez inhibicję kinaz PIM w liniach komórkowych DLBCL i badanie następstw inhibicji na trzech poziomach: na poziomie chromatyny, na poziomie globalnej ekspresji genów oraz na poziomie komórkowym. Recenzowana rozprawa bardzo dobrze wpisuje się w nurt badań prowadzonych w instytucie, w którym pracuje doktorantka. Jest ich logiczną kontynuacją jak również inspiruje koleżanki i kolegów z zespołu do stawiania dalszych pytań, które w sposób naturalny powstały podczas realizacji rozprawy. Doktorantka stawia trafną hipotezę, że inhibicja badanych kinaz PIM będzie skutkować zaburzeniem homeostazy epigenetycznej, która pociągnie za sobą globalną deregulację genów a w konsekwencji wpłynie negatywnie na żywotność komórek nowotworowych. Doktorantka zakłada, że potwierdzenie stawianej hipotezy może stanowić istotny argument za włączeniem tej grupy inhibitorów do terapii pacjentów z DLBCL charakteryzujących się nadekspresją PIM.

Niewątpliwie stawiana hipoteza, jak i cała rozprawa doktorska, wpisuje się w bardzo istotny nurt badań w obrębie genetyki chłoniaków, mianowicie w poszukiwanie nowych, molekularnych celów terapii a co za tym idzie, terapii zindywidualizowanej. Należy podkreślić, że tego typu badania poszerzają także naszą wiedzę z obszaru badań podstawowych w biologii molekularnej. Wybór przedmiotu badań jest też niewątpliwie trafny z przyczyn epidemiologicznych. DLBCL to najczęstszy chłoniak nieziarniczy na świecie o bardzo agresywnym przebiegu. Stąd wybór tematyki rozprawy jest trafny co jest zasługą samej doktorantki jak Pana i Pani promotor.

Przygotowana przez Panią mgr Sonię Dębek rozprawa doktorska liczy 125 stron i jest podzielona w sposób klasyczny na wstęp, cel badań, materiały i metody, wyniki oraz dyskusję. Całość rozpoczynają streszczenia przygotowane w języku polskim i angielskim oraz spisy odpowiednio: treści, rycin i tabel oraz stosowanych skrótów. Rozprawę kończy zaś rozdział poświęcony wnioskowi oraz spis dobrze dobranej i aktualnej, cytowanej literatury zawierający 207 pozycji. Chciałbym jedynie zwrócić uwagę, że tytuł w streszczeniu polskim nieznacznie odbiega od brzmienia tytułu w języku angielskim co uznaję za drobne potknięcie w tłumaczeniu.

Chciałbym trochę więcej uwagi poświęcić wstępowi rozprawy. Jest on moim zdaniem znakomity. Jest napisany pięknym a zarazem bardzo klarownym, naukowym językiem angielskim co sprawiło, że z przyjemnością czytałem kolejne rozdziały. Pod względem merytorycznym dostarcza on w pełni niezbędnej wiedzy dla zrozumienia dalszych części rozprawy. Wstęp jest zarazem świadectwem dogłębnej znajomości przedmiotu przez doktorantkę, która w precyzyjny sposób przedstawia przekonujące argumenty za stawianą tezę o roli PIM w patogenezie DLBCL i znaczeniu wyciszenia tej grupy kinaz. **Tym samym stwierdzam, że rozprawa doktorska w pełni prezentuje bardzo dobrą, ogólną wiedzę teoretyczną doktorantki w dyscyplinie nauki medyczne.**

Do tej części rozprawy mam jedynie kilka drobnych uwag. Na str. 13 doktorantka stwierdza „Analiza zasugerowała...” ładniej brzmiałoby „Wyniki analizy sugerują...”; na str. 16 zabrakło statystyk dotyczących DLBCL dla Unii Europejskiej. Mam również zastrzeżenia do ryciny 1.1, która ma zbyt niską rozdzielczość. Są to jednak drobiazgi nie zmieniające nic w mojej bardzo wysokiej ocenie wstępu rozprawy.

Także rozdział poświęcony materiałom i metodom jest przygotowany starannie i zawiera wszystkie niezbędne informacje umożliwiające prześledzenie prowadzonych eksperymentów. Dobrym pomysłem jest podział tej części rozprawy na typy stosowanych

metod, który uporządkował przedstawione opisy. Ponadto rozdział ten jest zaopatrzony w bardzo informatywną rycinę 3.3. Co istotne, ta część rozprawy jest zarazem dowodem na bardzo szeroką gamę technik biologii molekularnej i komórkowej jaką dysponuje doktorantka. Są to aktualne i zaawansowane techniki inżynierii genetycznej, odpowiednio dobrane do stawianych w rozprawie pytań badawczych. Przeprowadzane eksperymenty z wykorzystaniem opisanych w rozprawie technik są zaprojektowane poprawnie. **Tym samym stwierdzam, że rozprawa doktorska w pełni wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez doktorantkę.**

Mam jednak kilka uwag do tej części rozprawy. W badaniach przy użyciu real-time PCR stosowano jeden gen referencyjny (*GAPDH*) natomiast złotym standardem jest stosowanie dwóch genów referencyjnych. Na str. 61 odnośnik „Table 3.5” przekierowuje do niewłaściwej tabeli. Natomiast w podrozdziale 3.3.3.1 na str. 62, odnoszącym się do badania ekspresji genów metodą mikromacierzową, dalsza informacja dotycząca obróbki bioinformatycznej sugeruje analizę danych uzyskanych techniką RNA_seq. Ponadto, w omawianym rozdziale brakuje informacji o uzyskaniu stosownych zgód na prowadzenie badań z użyciem GMM. Zastanowiłem się także nad informacją podaną w tekście, że w badaniach stosowano mrożony uprzednio supernatant z lentiwirusem. Chętnie przedyskutuję z doktorantką tę kwestię podczas obrony ponieważ z obserwacji poczynionych w mojej grupie wynika, że mrożenie supernatantu zawierającego cząsteczki wirusa może negatywnie wpływać na wydajność transdukcji.

Z dużym zainteresowaniem przeczytałem także część rozprawy poświęconą wynikom. Podobnie jak wcześniejsze części jest ona napisana bardzo dobrze oraz przedstawia wiele niezwykle istotnych odkryć. Szczególnie ciekawe są chociażby wyniki dotyczące lokalizacji subkomórkowej białek PIM, dostarczające istotnych informacji na temat ich funkcjonowania w komórce. Precyzyjne wyjaśnienie funkcji PIM dostarczyły z kolei analizy zmian epigenetycznych po inhibicji pan-PIM oraz globalna analiza ekspresji genów. Uzyskane przez doktorantkę wyniki pozwoliły na określenie szlaków sygnałowych deregulowanych po inhibicji i tym samym określenie roli kinaz PIM w regulacji ekspresji genów zaangażowanych w takie procesy jak metabolizm DNA czy naprawę DNA. Ważnym odkryciem rzucającym światło na regulację ekspresji genów w komórkach człowieka niezależnie od badanego modelu jest również wskazanie na powiązanie PIM z funkcjonowaniem super enhancerów.

Chciałbym podkreślić dużą dojrzałość naukową doktorantki, która nie unika przedstawienia także wyników negatywnych czy niepowodzenia w przeprowadzeniu niektórych eksperymentów, co jest przecież częścią naszej pracy. Czytając omawiany rozdział

z wielką satysfakcją przyjmowałem fakt, że często przychodziła mi do głowy myśl, że należałoby teraz przeprowadzić tak a taki eksperyment aby jeszcze lepiej wyjaśnić dany problem badawczy po czym znajdowałem dokładnie taki eksperyment w dalszej części pracy. Warto także zwrócić uwagę na powtarzalność otrzymywanych przez doktorantkę wyników czy to w testach proliferacji czy w analizach wysokoprzepustowych linii komórkowych. Świadczy to o bardzo dobrym warsztacie eksperymentalnym Pani Dębek.

Po stronie uchybień, które nie rzutują na moją bardzo wysoką ocenę tego rozdziału chciałbym wymienić brak przedstawienia wyciszenia PIM1 konstruktem shRNA w formie ilościowej a także brak potwierdzenia przeprowadzonej mutagenazy kierunkowej poprzez pokazanie wyników sekwencjonowania (podrozdział 4.5). Ponadto na rycinie 4.8 D wyróżniłbym także wzbogacenie w geny warunkujące stan zapalny w tym NFκB, funkcjonalnie powiązane z patogenezą chłoniaków. Z drobiazgów chciałbym także zwrócić uwagę na poprawną pisownię „Western blot” – z wielkiej litery. Jako osoba wywodząca się z zakładu zajmującego się pierwotnie procesami mutagenazy zadaję sobie także pytanie czy zwiększony poziom uszkodzeń DNA zaobserwowany przez doktorantkę pośrednio, poprzez obecność markera γH2AX (podrozdział 4.9) byłby także obserwowalny w klasycznych testach uszkodzeń DNA typu *comet assay*?

Podsumowując tę część recenzowanej rozprawy doktorskiej stwierdzam, że stanowi ona oryginalne rozwiązanie stawianego problemu naukowego.

Nie mam także większych uwag do dyskusji uzyskanych wyników badań. Jest ona napisana w sposób bardzo dobry, doktorantka dyskutuje uzyskane wyniki w świetle literatury przedmiotu. Co ważne omawiane są wyniki zgodne ze stawianą hipotezą jak i te odbiegające od wstępnych założeń.

Całość rozprawy kończą wnioski, które dobrze odnoszą się do postawionych celów i odpowiadają na najważniejsze pytania naukowe sformułowane w rozprawie. Bardzo istotne są także konkluzje dotyczące znaczenia inhibicji kinaz PIM w terapii DLBCL – są to wnioski o istotnym znaczeniu klinicznym. Tym samym doktorantka w bardzo umiejętny sposób przełożyła niezwykle ciekawe wyniki badań podstawowych na praktykę kliniczną co zasługuje na szczególne uznanie. Do tej części pracy mam tylko jedną uwagę. Jednym z celów pracy było określenie roli PIM w przeżyciu i proliferacji komórek DLBCL natomiast w punkcie 4 wniosków doktorantka odnosi się szczegółowo do H3S10ph a nie do PIM co jest skrótem myślowym. Ponadto określenie „participates” nie jest precyzyjne i powinno być zastąpione konkretnym stwierdzeniem czy inhibicja PIM ma działanie pro czy anty proliferacyjne.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Sonii Marii Dębek jest pracą niezwykle ciekawą, napisaną pięknym językiem i bardzo starannie zredagowaną, wykonaną nowoczesnymi i dobrze zaprojektowanymi eksperymentami. Co istotne, jest to rozprawa wnosząca zarówno do nauk podstawowych obszaru genetyki nowotworów jak i mogąca mieć wpływ na stosowaną terapię DLBCL.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa doktorska przygotowana przez mgr Sonię Marię Dębek spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668). Ponadto, ze względu na znaczące wkład jaki rozprawa wnosi w rozumienie patogenezy DLBCL a także jej znaczenie dla poprawy terapii tej choroby wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych WUM o wyróżnienie rozprawy.

Maciej Giefing



