

Prof. dr hab. n. med. Mirosław Markiewicz

Rzeszów 21.02.2024

Zakład Hematologii, Instytut Nauk Medycznych

Kolegium Nauk Medycznych, Uniwersytet Rzeszowski

Klinika Hematologii, Uniwersytecki Szpital Kliniczny

im. Fryderyka Chopina w Rzeszowie

ul. Szopena 2, Rzeszów 35-055

Recenzja

rozprawy doktorskiej na stopień naukowy doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne mgr inż. **Moniki Pępek** pt.

„Charakterystyka nowych zmian genetycznych w przewlekłej białaczce szpikowej u chorych w różnych stadiach choroby przy zastosowaniu sekwencjonowania następnej generacji”

wykonanej w Zakładzie Biologii i Genetyki Nowotworów WUM w Warszawie pod kierunkiem prof. dr. med. Tomasza Stokłosa

Dokonany w ciągu ostatnich kilku dekad rozwój nowoczesnych metod diagnostyki molekularnej umożliwił dokonanie kapitalnego postępu w dziedzinie diagnostyki i leczenia przewlekłej białaczki szpikowej (CML). Mimo to jednak część pacjentów nie odpowiada na stosowane inhibitory kinaz tyrozynowych, są oni narażeni na znaczną chorobowość i śmiertelność. U podłoża występującej oporności na leczenie leżą dodatkowe zmiany genetyczne i właśnie ich identyfikacja i znaczenie kliniczne stanowią przedmiot pracy.

Na przeprowadzenie badania uzyskane zostały zgody komisji bioetycznych WUM, IHiT i WIM, a jego koszty sfinansowano w ramach grantu NCN Harmonia, którego doktorantka była głównym wykonawcą, a promotor, prof. dr med. Tomasz Stokłosa - kierownikiem projektu.

Rozprawa doktorska liczy 125 stron tekstu, zawiera niezbędne rozdziały, jest starannie przygotowana, nie wymaga korekt redakcyjnych.

Wstęp pracy, zawarty na 19 stronach, jest przejrzysty i wyczerpujący, a w części dotyczącej występowania pseudogenów jest szczególnie interesujący. Doktorantka jasno przedstawiła niezbędne informacje dotyczące epidemiologii, etiopatogenezy, diagnostyki i leczenia przewlekłej białaczki szpikowej. Wyjaśniła pojęcie pseudogenów, ich klasyfikację i znaczenie w nowotworzeniu, szczególnie w odniesieniu do pseudogenu SMAD4. Przedstawiła przegląd wiedzy związanej z tematyką pracy, uzasadniający podjęte w rozprawie badania zmierzające do identyfikacji nowych zmian genetycznych występujących w komórkach białaczkowych u chorych z niekorzystnym przebiegiem choroby.

W dalszej części rozprawy Doktorantka wskazała cel podjętych badań, na który składały się:

1. ocena profilu mutacji genetycznych, zmian liczby kopii i dodatkowych aberracji chromosomowych występujących u 45 chorych z CML, w tym u 25 w różnych stadiach zaawansowania choroby i u 20 w fazie blastycznej, oraz poszukiwanie zmian genetycznych o potencjalnym znaczeniu prognostycznym lub predykcyjnym,
2. porównanie zmian genetycznych występujących u 25 chorych przed i po progresji CML oraz ocena dynamiki zmian mogących mieć wpływ na progresję choroby, oraz
3. scharakteryzowanie na poziomie molekularnym przetworzonego pseudogenu SMAD4 oraz ocenę jego roli w patogenezie CML.

Materiał do badań wskazany w rozdziale Materiały i metody stanowiły krew, szpik, pelety leukocytów, cebulki włosowe bądź wyizolowane wcześniej DNA i został on pozyskany od łącznie 51 chorych z CML w ramach współpracy z 9 ośrodkami, znajdującymi się w Warszawie (4), Krakowie, Białymstoku, Lublinie, Zabrze oraz w Pradze czeskiej. Z materiału 45 chorych wyizolowano DNA genomowe, DNA linii zarodkowej oraz całkowite RNA, a następnie metodą NGS sekwencjonowano 950-1500 genów i wykonano analizę mutacji 193 genów oraz analizę liczby kopii. Szczegółową ocenę pseudogenu SMAD4 przeprowadzono na próbkach 3 spośród 25 chorych, u których wykryto jego obecność, oraz na próbkach dodatkowych 6 chorych posiadających ten pseudogen. Zastosowane metody obejmowały sekwencjonowanie NGS, reakcję PCR i metodę Sangera, w toku prac korzystano

ponadto m.in. z izolacji magnetycznej i znakowania fluorescencyjnego. Doktorantka przedstawiła zastosowane w pracy trudne, skomplikowane i zarazem supernowoczesne metody badawcze z wielką dokładnością, a jednocześnie w sposób przejrzysty i logiczny, co nie pozostawia najmniejszych wątpliwości co do tego, że warsztat badawczy opanowała w sposób perfekcyjny.

W analizie statystycznej Doktorantka zastosowała właściwe metody oceny częstości występowania zdarzeń, porównywania częstości zmian oraz prawdopodobieństwa występowania różnic.

W rozdziale Wyniki Doktorantka przedstawiła wyniki badań identyfikacyjnych zmian genetycznych występujących w różnych fazach klinicznych CML. Sposób prezentacji wyników jest przejrzysty, a zapoznanie się z nimi ułatwiają starannie przygotowane liczne tabele i ryciny. Doktorantka wykazała obecność wariantów patogennych lub prawdopodobnie patogennych, takich jak zmiany punktowe i małe insercje-delecje w genach często zmutowanych w nowotworach układu krwiotwórczego (ABL1, ASXL1, RUNX1, DNMT3A i TP53), zmiany liczby kopii (dotyczące genów IKZF1, CDKN2A, CDKN2B, BCR::ABL1) oraz dodatkowe aberracje chromosomowe (m.in. monosomia chromosomu 7 oraz złożony kariotyp). Prezentacja wyników oceny znamienności różnic w częstości występowania zmian przed i po progresji CML została zawężona do jednego wyniku istotnego i jednego na granicy istotności, czytający nie ma więc możliwości samodzielnej weryfikacji oceny zmian w pozostałych genach. W wyniku analizy porównawczej patogennych wariantów i zmian liczby kopii u chorych przed i po progresji CML Doktorantka zidentyfikowała 7 wzorców dynamiki nabywania, utrzymywania się i zanikania zmian genetycznych.

Szczególnie nowatorskie znaczenie ma część badań związana z oceną występowania i znaczenia pseudogenu SMAD4, dotychczas nieopisanego w chorobach nowotworowych. Badania Doktorantki nad pseudogenem SMAD4 są prowadzone metodycznie, zgodnie z logicznym tokiem wnioskowania dojrzałego naukowca. Zbadana została całkowita sekwencja pseudogenu SMAD4, ze znacznie krótszym fragmentem niepodlegającym translacji w porównaniu do genu SMAD4 położonego na chromosomie 18. Doktorantka wykazała istotny wzrost częstości jego występowania u chorych z CML w porównaniu do częstości występowania w populacji ogólnej, jak też w porównaniu do chorych z innymi rodzajami białaczek

(CLL, AML, ALL). Podana w Tabeli 22 znamienność występowania pseudogenu SMAD4 u chorych z CML w populacji czeskiej analizowanej osobno (brak znamienności) i razem z populacją polską (znamienność większa niż samej populacji polskiej) wydaje się niespójna, co wymaga sprawdzenia. Poszerzona analiza wykazała, że pseudogen SMAD4 ulega insercji na chromosomie 9, w pobliżu genu *ABL1* zaangażowanego w powstawanie chromosomu Ph. Wątek dotyczący możliwego wpływu insercji pseudogenu w region bliski locus *ABL1* na chromosomie 9 uważam za szczególnie interesujący i jako taki mógłby on zostać rozwinięty w dalszych badaniach nad ko-lokalizacją pseudogenu i rearanżacji chromosomowej. Drugi aspekt, który mógłby zostać dalej rozwinięty, dotyczy germinálnego charakteru pseudogenu SMAD4 i liczby jego kopii - czy jest to wariant heterozygotyczny, występujący każdorazowo w jednej kopii na genom diploidalny, czy też może on ulegać zwielokrotnieniu lub wtórnemu usunięciu w komórkach nowotworowych? Wskazywać na to mógłby obraz elektroforetyczny z rycin 16 i 17 - zastanawiająca jest nierównowaga intensywności prążków na żelu z ryciny 17, w której prążek pseudogenu (o wielkości 200 pz, ścieżka 1) z cebulki włosowej jest wyraźniejszy niż prążek w materiale nowotworowym (ścieżki 2 i 4). W tym względzie widać przestrzeń do dalszych badań i dociekań naukowych.

Wyniki zostały przedstawione w formie klarownych rycin o wysokiej estetyce i znacznej wartości merytorycznej, wykorzystano przy tym bogaty wybór oprogramowania analitycznego i komputerowej obróbki graficznej. Takie ujęcie wyników stanowi cenny wkład do dysertacji i nie tylko świadczy o dojrzałości naukowej i profesjonalizmie Doktorantki, ale także czyni pracę atrakcyjną wizualnie.

W dyskusji Doktorantka wykazała umiejętność korzystania z aktualnego piśmiennictwa i odniesienia uzyskanych wyników do dotychczasowej wiedzy.

Piśmiennictwo liczy 194 pozycje (w tym 55 czyli niemal 1/3 z ostatnich pięciu lat 2019-2023), które są wyczerpujące, adekwatnie dobrane oraz zgodne z tematyką rozprawy.

Wnioski są zwięźle sformułowane i odpowiadają na zaplanowane cele. Opierają się przede wszystkim na analizie występowania zmian genetycznych w badanych próbkach poszczególnych chorych, w niewielkiej części zostały poparte wynikami istotnymi statystycznie.

Wniosek nr 1. U chorych z CML na różnych etapach zaawansowania choroby zidentyfikowano obecność wariantów patogennych lub prawdopodobnie patogennych poszczególnych genów. Spośród wymienionych we wniosku nr 1. licznych zmian jedynie w odniesieniu do genu *RUNX1* potwierdzono znamienny statystycznie wzrost wariantów patogennych po progresji do fazy blastycznej, a w odniesieniu do genu *IKZF1* wzrost będący na granicy znamienności, zatem znaczenie prognostyczne wykazano tylko wobec jednego (ewentualnie dwóch) genów, natomiast pozostałe należy zaliczyć do grupy o potencjalnym znaczeniu prognostycznym.

Wniosek nr 2. Porównanie zmian genetycznych występujących u 25 chorych przed i po progresji CML doprowadziło do identyfikacji 7 wzorców dynamiki zmian genetycznych związanych z nabywaniem, utrzymywaniem się lub zanikaniem aberracji genetycznych.

Wniosek nr 3. Częstość występowania pseudogenu *SMAD4* u pacjentów z CML jest znamiennie większa niż w populacji ogólnej. Dotychczas jego występowanie w chorobach nowotworowych nie zostało opisane przez innych badaczy. Jednocześnie scharakteryzowano przetworzony pseudogen *SMAD4* na poziomie molekularnym i wykazano, że jest on wariantem zarodkowym, który nie ulega transkrypcji i nie wpływa na ekspresję innych genów oraz nie ma bezpośredniego wpływu na progresję CML, jednak może mieć rolę w inicjacji i patogenezie tej choroby, czego rozstrzygnięcie wymaga dalszych badań.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że podjęta przez Doktorantkę problematyka badawcza jest niezmiernie aktualna. Obecnie trwają poszukiwania czynników, które mogłyby być pomocne w przewidywaniu progresji choroby, wciąż stanowiącej poważny problem kliniczny, oraz przyczyn występowania oporności komórek CML na stosowane w leczeniu inhibitory szlaków sygnałowych. Tym bardziej każde nowe i oryginalne badanie genetycznego podłoża występowania i przebiegu CML i jej leczenia jest ważne i może się przyczynić do lepszego zrozumienia i opanowania choroby. Założenia badawcze niniejszej pracy zostały sformułowane prawidłowo, badania zostały przeprowadzone przy użyciu najnowocześniejszych metod. Uzyskano wartościowe wyniki, pozwalające na udzielenie odpowiedzi na założone cele badawcze i na przypisanie pracy atrybutu nowości. Część wyników uzyskanych przez Doktorantkę może być polem do dalszych, szerzej zakrojonych badań nad

związkiem nosicielstwa pseudogenu z transformacją i progresją nowotworową w CML.

Na podstawie oceny przedstawionej pracy stwierdzam, że 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), to też wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr inż. Moniki Pępek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, ze względu na nowatorski charakter pracy opartej o nowoczesny warsztat badawczy, jej dużą wartość poznawczą i wysoką ocenę merytoryczną oraz staranne przygotowanie składam wniosek o wyróżnienie pracy.

Prof. dr hab. n. med. Mirosław Markiewicz