



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii
Instytut Genetyki i Biotechnologii
prof. dr hab. Katarzyna Tońska



Warszawa 26.03.2024

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Monika Pępek pt.: „Charakterystyka nowych zmian genetycznych w przewlekłej białaczce szpikowej u chorych w różnych stadiach choroby przy zastosowaniu sekwencjonowania następnej generacji”.

Przewlekła białaczka szpikowa (CML) stanowi znakomity przykład tego w jaki sposób wiedza o podłożu genetycznym choroby przekłada się na skuteczne leczenie. Jest nie tylko pierwszą chorobą, w której wykazano, że podłożem nowotworzenia są mutacje genetyczne, ale także pierwszą taką chorobą gdzie na podstawie wiedzy o rodzaju zmiany genetycznej udało się zaproponować leki – inhibitory kinaz tyrozynowych - skutecznie przekształcające chorobę śmiertelną w chorobę przewlekłą, a czasem nawet pozwalające na całkowite wyleczenie. Jest także dość wyjątkową chorobą nowotworową gdzie potwierdzeniem diagnozy jest właśnie stwierdzenie obecności konkretnej mutacji – prowadzącej do powstania fuzji genów *BCR::ABL1*. Ten relatywnie prosty obraz z czasem zaczął się jednak komplikować: pacjenci w różnym stopniu odpowiadali na leczenie czy też wykazywali oporność na konkretne inhibitory kinaz tyrozynowych bądź od samego początku, bądź też w miarę leczenia. Ewidentne się stało, że CML nie jest jednorodna genetycznie zarówno w momencie diagnozy jak i na kolejnych etapach rozwoju choroby. Poznanie tła genetycznego na którym „działa” fuzja *BCR::ABL1* mogłoby z jednej strony pozwolić na prognozowanie przebiegu choroby, ale także dopasować leczenie. Mgr inż. Monika Pępek gdy podejmowała się realizacji badań opisanych w jej dysertacji doktorskiej, za cel postawiła sobie określenie rodzaju zmian mogących mieć związek z progresją CML.

ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa
tel.: 22 592 22 44, faks: 22 658 41 76
e-mail: kaska@igib.uw.edu.pl
<http://www.igib.uw.edu.pl>

Forma pracy ma charakter klasyczny i taki też układ. Wstęp jest znakomicie napisany. W pierwszej części świetnie wprowadza czytelnika zarówno w zagadnienie CML jako choroby, przedstawia jej diagnostykę, leczenie oraz znaną zmienność genetyczną. Szczególnie ciekawy okazał się dla mnie kolejny rozdział dotyczący pseudogenów, w którym znalazły się nie tylko informacje niezbędne do tego, aby zrozumieć sens prowadzonych badań, ale także pewna perspektywa historyczna czy ewolucyjna, przy czym udało się doktorantce zachować „dobre tempo” tego rozdziału.

Także rozdział Materiały i metody jest dobrze napisany i kompletny. Szczególnie cenna jest Rycina 4 pokazująca schemat prowadzonych doświadczeń, szczególnie, że od pewnego momentu konkretne badania dotyczą nie tylko wyjściowego zbioru próbek materiału biologicznego od 45 chorych, ale szerszych zbiorów próbek białaczkowych i kontrolnych, czy też podzbiorów powyższych zbiorów. Bez schematu trudniej byłoby się zorientować w założonym planie badań. Mgr inż. Monika Pępek może pochwalić się szerokim wachlarzem technik analiz molekularnych zarówno na poziomie laboratoryjnym (planowanie i optymalizacja PCR, sekwencjonowanie metoda Sangera, sekwencjonowanie DNA metodami wysokoprzepustowymi, RNAseq) jak i analizy danych (wyniki NGS). Do tego rozdziału mam jedno pytanie odnośnie do wyboru 193 genów związanych z nowotworami hematologicznymi i onkogenezą. Zastosowane protokoły sekwencjonowania NGS pozwalały na sekwencjonowanie od 950 do 1500 genów. Jak wynika z Dyskusji to, który z protokołów został zastosowany wynikało z tego kiedy dana próbka była sekwencjonowana – jest zrozumiałe, że zgromadzenie materiału trwało. Na ile wybór 193 genów do analizy był ograniczony przez liczbę genów znajdujących się w panelu? Czy z konieczności pominięte zostały jakieś geny, które doktorantka chętnie widziałaby na tej liście?

Wyniki stanowią najobszerniejszą część pracy. Doktorantka analizuje obecność różnych rodzajów zmienności genetycznej w badanych próbach: substytucji, punktowych delecji i insercji, zmian liczby kopii oraz obecności aberracji chromosomowych, kataloguje je i określa ich charakter. Niestety nigdzie w pracy nie umieszczono zbiorczego spisu znalezionych wariantów punktowych. Wiemy, że część z nich to „typowe warianty zmiany sensu w domenie kinazowej” (odnośnie genu *ABL1*). Z dalszych części pracy możemy się dowiedzieć, że część znalezionych przez nią wariantów ma charakter protekcyjny czy też prognostyczny, jednak samodzielnie możemy się przyjrzeć tylko niektórym, bardziej szczegółowo omówionym w Dyskusji. Uważam, że taki spis powinien się znaleźć gdzieś na końcu pracy, w aneksie wraz z krótką charakterystyką klasyfikacji znalezionych wariantów (wariant patogenny, czy VUS, znana funkcja itp.).

Na podstawie analizy obecności wariantów w próbkach pochodzących od pacjentów przed i podczas progresji choroby Doktorantce udaje się sklasyfikować przebieg zmian genetycznych w przypadku progresji CML pod postacią 7 scenariuszy, które przedstawia w przepięknej Tabeli 21. Jest to bardzo cenna obserwacja, pokazująca niestety jak bardzo skomplikowany jest proces chorobowy. Próbki wykazywały różnice genetyczne jeszcze zanim nastąpiła progresja, a potem możemy obserwować na jak wiele sposobów może dojść do tego samego niekorzystnego efektu – zaostrzenia objawów. Co więcej, nawet w przypadku par próbek zaklasyfikowanych do tego samego wzorca nie można mówić o tych samych mutacjach, a nawet mutacjach w obrębie tych samych genów. Wyraźnie widać, że każdy pacjent ma swoją prywatną chorobę nowotworową o indywidualnym profilu genetycznym. W tej chwili można te wyniki uznać za pesymistyczne, gdyż trudno wyciągnąć z nich bardziej ogólne wnioski, w przyszłości jednak, po zgromadzeniu danych z jeszcze wielu takich badań, mogą stanowić podstawę do spersonalizowania leczenia.

Powyższe wyniki wykazały dość częstą obecność pseudogenu *SMAD4*. Ta obserwacja wzbudziła zainteresowanie i skłoniła do bliższego przyjrzenia się jego roli w patogenezie CML. Dalsze badania przyniosły bardzo interesujące efekty. *PSMAD4* był obecny z wyższą częstością u osób z CML niż w grupie kontrolnej czy u osób z innymi nowotworami hematologicznymi. Bardziej szczegółowe analizy potwierdziły, że obecność *PSMAD4* ma charakter germinalny a pseudogen nie ulega ekspresji. Scharakteryzowano także warianty innych genów w badanych próbkach.

Właśnie przedstawienie możliwych scenariuszy związanych z progresją i obserwacja dotycząca częstości występowania *PSMAD4* uważam za najważniejsze osiągnięcia opisane w niniejszej pracy. Doceniam także umiejętność podążania za uzyskiwanymi wynikami i planowania kolejnych kroków tak, aby spróbować wyjaśnić sens uzyskanego wyniku.

Ze względu na wielość danych i różnorodność analizowanych typów zmienności Dyskusja musiała stanowić wyzwanie dla doktorantki. Ponownie wywiązała się z tego zadania świetnie. Umiejętnie omawia i dyskutuje z literaturą przedmiotu uzyskane wyniki gen po genie. Ponownie sporo miejsca poświęca *PSMAD4*. Z niecierpliwością oczekiwałam opinii doktorantki odnośnie wpływu obecności tego pseudogenu na rozwój i progresję CML skoro najprostsze wyjaśnienie, czyli jego ekspresja zostało wykluczone. I nie zawiodłam się – jest to niezwykle ciekawy fragment, w którym rozważana jest, z należytą ostrożnością, możliwość wpływu obecności pseudogenu na destabilizację struktury długiego ramienia chromosomu, a co za tym idzie częstości powstawania translokacji t(9;22) – przy takim scenariuszu można by mówić o znaczeniu w inicjacji

choroby nie zaś w jej progresji. W Dyskusji mgr inż. Monika Pępek zauważa, że częstość występowania *PSMAD4* w grupie kontrolnej jest dwukrotnie wyższa niż w badaniach brytyjskich i amerykańskich. Czy można to powiązać z różnicą w częstości występowania CML pomiędzy Polską a Stanami Zjednoczonymi czy Wielką Brytanią?

Na koniec chciałabym się odnieść do redaktorskiej strony pracy. Podczas czytania uwagę zwraca bardzo staranne jej przygotowanie pod kątem korektorskim (nie jestem z pewnością najbardziej uważną czytelniczką, ale zapewne więcej literówek jest w tej recenzji niż w ocenianej Pracy). Także formatowanie i szata graficzna są na bardzo wysokim poziomie. W całej pracy zastosowana jest prawidłowa nomenklatura opisywania zmian genetycznych, a także zapisu nazw genów i białek. Doktorantka wykazuje się także dużą dbałością o precyzję wysławiania się. Za przykład niech służy fragment ze str. 60 „Patogenne zmiany wykryte w ramach niniejszej pracy doktorskiej określane są mianem patogennych wariantów, a nie mutacji, gdyż brak materiału zarodkowego uniemożliwia jednoznaczne potwierdzenie somatycznego charakteru wykrytych zmian.” Ileż to razy terminy „mutacja” i „wariant” są stosowane zamiennie bez głębszej refleksji?! Jak to jednak zwykle bywa nie udało się autorce uniknąć błędów, z których dwa niejako nadepnęły mi na odcisk. Po pierwsze w całej pracy stosowany jest termin egzon, podczas gdy prawidłowo jest to ekson. Termin ten jest oczywiście przekładem angielskiego słowa „exon”, które jednak wywodzi się od „expression”, a zatem początek egzo kojarzący się z czymś zewnętrznym nie wydaje się uprawniony. Drugim „odciskiem” jest rozwinięcie skrótu PCR (ang. *polymerase chain reaction*) na „reakcja łańcuchowej polimerazy”, a to nie polimeraza jest łańcuchowa, a reakcja. Zatem jest to „reakcja łańcuchowa polimerazy”. Chętnie też podyskutuję o używaniu słowa „zarodkowy” czy „linii zarodkowej” w kontekście wariantów niebędących wariantami somatycznymi, obecnych w komórkach nienowotworowych organizmu. Brzmi to niezręcznie, szczególnie w sformułowaniach takich jak izolacja DNA zarodkowego (tak jakby była przeprowadzana izolacja DNA z zarodka), czy też izolacja DNA linii zarodkowej z cebulek włosowych. Przeprowadzona przeze mnie na niewielką (kilku zaprzyjaźnionych genetyków) skalę ankieta wskazuje na określenie „germinalny” jako lepsze. Na poziomie cytogenetycznym istnieje określenie dobrze oddające sytuację, o którą chodzi, mianowicie „kariotyp konstytutywny”, w przypadku zmian o małej skali jak widać nie za bardzo.

Fakt, że sporo miejsca poświęcone zostało uwagom nomenklaturowym wynika po części z faktu, że większych uwag merytorycznych nie mam. Praca jest efektem wieloosrodkowej współpracy. Stanowi kompleksowe opracowanie zagadnienia obecności różnych rodzajów zmienności oraz jej dynamiki podczas progresji CML i znacząco poszerza wiedzę na ten temat. Świadczy także o tym, że Doktorantka osiągnęła dojrzałość pozwalającą jej wejść na kolejny stopień rozwoju naukowego.

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 41 104, faks: 22 55 41 106
e-mail: dziekan@biol.uw.edu.pl
<http://www.biol.uw.edu.pl>

W podsumowaniu stwierdzam zatem, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Moniki Pępek pt. „Charakterystyka nowych zmian genetycznych w przewlekłej białaczce szpikowej u chorych w różnych stadiach choroby przy zastosowaniu sekwencjonowania następnej generacji” stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego, spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668) i może stanowić podstawę do nadania stopnia doktora. W związku z powyższym, zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych WUM o dopuszczenie mgr inż. Moniki Pępek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie mając na względzie wysoki poziom naukowy rozprawy, kompleksowe podejście do badanego zagadnienia oraz aspekt praktyczny – w przyszłości uzyskane wyniki mogą przyczynić się do lepszego prognozowania rozwoju choroby bądź jej progresji, a nawet umożliwić wprowadzanie personalizowanych terapii, wnioskuję o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.

