

Poznań, 10 czerwca 2019 roku

Sz. P.

Prof. dr hab. Ryszard Słomski

Przewodniczący Komisji Doktorskiej

RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ

mgr Bronisława Szarzyńska-Zawadzka z Instytutu Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu pt.:

”Czynniki genetyczne w dziecięcej ostrej białaczce limfoblastycznej z prekursorów limfocytów T (T-ALL): ocena wartości prognostycznej i znaczenia w biologii choroby”.

Przedstawiona do recenzji praca obejmuje 117 stron tekstu w tym wstęp (strony 9-26), 3 publikacje będące podstawą pracy doktorskiej (strony 27-96), wnioski (strony 97), streszczenie polskie i angielskie (strony 98-101) oraz 15 oświadczeń współautorów prac o znaczącym udziale doktorantki w realizowanym projekcie badawczym (strony 119-133).

Poparta jest 158 aktualnymi, właściwie dobranymi do poruszanego zakresu zagadnień pracami z piśmiennictwa naukowego (strony 102-117).

We wstępie do pracy we właściwy sposób zaprezentowano niezbędne informacje dotyczące podziału i etiologii ostrej białaczki limfoblastycznej T-komórkowej (T-ALL), częstości jej występowania oraz charakterystyki klinicznej oraz molekularnej. Szczególnie dużo uwagi Autorka poświęciła mechanizmom genowym prowadzącym do aktywacji onkogennych czynników transkrypcyjnych w tym TAL1, TAL2, TLX1 (HOX11), TLX3 (HOX11.2), HOXA, LYL1, LMO1, LMO2, NKX2.1, NKX2.2 oraz MYC (translokacje) czy też w wyniku działania super wzmacniaczy transkrypcji (mutacje somatyczne w rejonach niekodujących genomu lub w wyniku powstawania genów fuzyjnych np. SIL-TAL1. Proces ten został omówiony w sposób obszerny i ciekawy.

Także zaburzenia w obrębie mechanizmów aktywacji ścieżek sygnałowych w progenitorowych komórkach krwiotwórczych zostały przedstawione w sposób jasny i wyczerpujący. Obraz kliniczny ostrej białaczki limfoblastycznej oraz metody jej leczenia przedstawiono w sposób skrótowy, nie unikając jednak błędów. Do objawów ogólnych w hematologii zalicza się bowiem jedynie gorączkę bez uchwytnej przyczyny, nasilone poty oraz istotny spadek wagi ciała. Pozostałe wymienione

objawy mogą się pojawić wskutek niedokrwistości, małopłytkowości czy też gwałtownie zwiększającej się „masy” komórek białaczkowych w obrębie jam szpikowych (ból kostny).

Odrębną część wstępu stanowi omówienie czynników istotnie wpływających na wyniki terapii (remisja hematologiczna, cytometryczna, molekularna), przeżycie wolne od zdarzeń oraz przeżycie całkowite u chorych na B-ALL. Autorka słusznie podkreśla, że z wyjątkiem redukcji blastozy po leczeniu oraz uzyskania niemierzalnej choroby resztkowej (MRD) czynniki te nie odgrywają istotnej roli w przypadku T-ALL zwracając jednocześnie uwagę na pilną potrzebę zidentyfikowania genetycznych czynników prognostycznych w tych przypadkach, co ułatwiłoby podejmowanie właściwych decyzji terapeutycznych.

Duża część wstępu poświęcona jest omówieniu klasyfikacji immunologicznej T-ALL oraz propozycji klasyfikacji molekularno-cytogenetycznej tej choroby zaproponowanej w 2016 roku. Końcowa część wstępu poświęcona jest nowym markerom prognostycznym w T-ALL oraz terapiom celowanym. Autorka podkreśla szczególne znaczenie i mutacji genu *PTEN*, także w kontekście aberracji *NOTCH1*, *FBXW7* i *RAS*. Ocena ich występowania umożliwia bowiem wyodrębnienie spośród chorych z T-ALL wysokiego ryzyka osoby o lepszym rokowaniu. Podkreśla także, że wykazanie obecności określonych zaburzeń molekularnych (np. genów fuzyjnych z udziałem c-ABL kodującego kinazę tyrozynową c-ABL -*NUP214-ABL1*, *ZBTB16-ABL1*), białek antyapoptotycznych (Bcl2 – venetoklaks). Wymienione aspekty praktyczne szczegółowej oceny molekularno-cytogenetycznej stanowią istotną przesłankę pracy, której celem była identyfikacja czynników genetycznych o znaczeniu prognostycznym u chorych na prekursorowe postaci T-ALL. Ocenie poddano związek obecności wybranych zmian genetycznych, w tym obecność translokacji z udziałem genu *MYC*, mutacji genowych oraz zmian liczby kopii onkogenów i genów supresorowych zaangażowanych w patogenezę T-ALL z manifestacją kliniczną choroby, dynamiką odpowiedzi na leczenie, poziomem MRD ocenianym cytometrycznie, a także przeżyciem całkowitym, wolnym od zdarzeń i wolnym od wznowy choroby.

Podstawą rozprawy doktorskiej są 3 prace poświęcone współwystępowaniu t(8;14)(q24;q11) z zaburzeniami *PTEN*, delecjami *STIL/TAL1* i *CDKN2A/B* u 4 letniego chłopca z T-ALL, metodologicznym i finansowym aspektem oceny występowania mutacji *DNMT3A* u chorych na T-ALL oraz związkowi obecności zaburzeń genu *PTEN* ze złym przebiegiem T-ALL.

W pierwszej z prac Autorka potwierdziła związek pomiędzy brakiem odpowiedzi na leczenie i rozwojem oporności na terapię spowodowanej prawdopodobnie ewolucją klonalną/selekcją klonalną choroby z przetrwaniem klonu z obecnymi t(8;14)(q24;q11) oraz inaktywującymi mutacjami *PTEN* oraz *CDKN2A/B*. Szczególną wartość tej pracy stanowi wniosek końcowy sugerujący poszukiwania nowego podejścia terapeutycznego w tych przypadkach.

Kolejna praca będąca podstawą rozprawy doktorskiej poświęcona jest opracowaniu taniej i szybkiej metody przesiewowej umożliwiającej ocenę obecności zmian sekwencji genu metylotransferazy DNA – DNMT3A u chorych na T-ALL. Analizę wykonano w oparciu o ocenę obecności zaburzeń w obrębie wymienionego genu u 74 dzieci z T-ALL leczonych protokołami ALL IC-BFM 2002 i ALL IC-BFM 2009. Wyniki badań nie potwierdziły częstego występowania aberracji DNMT3A w tej grupie pacjentów co jest zgodne z obserwacjami innych autorów. Wykazanie obecności c.1930G>A(Ala644Thr) u jednego z ocenianych chorych potwierdza jednak przydatność przyjętego przez Autorkę algorytmu poszukiwań (HRM/SS). Przyjęta metodologia pracy potwierdziła możliwość szybkiej i uzasadnionej ekonomicznie oceny obecności zmian w obrębie dużego, wysoce zmiennego genu (eksony 8-23).

W trzeciej pracy oceniono obecność aberracji genu PTEN u 162 dzieci z T-ALL. Występowanie zmian genowych oceniono za pomocą sekwencjonowania nowej generacji całego genomu (sWGS) z niskim pokryciem, amplifikacji multipleks zależnej od ligacji sond molekularnych (MLPA) oraz analizy topnienia DNA z wysoką rozdzielczością (HRM). W wyniku tak kompleksowej oceny zidentyfikowano łącznie 130 wariantów genetycznych i małych insercji/delecji. W konkluzji pracy autorka potwierdza negatywne znaczenie zmian w obrębie PTEN (wysokie ryzyko niepomyślnego przebiegu choroby zarówno w odniesieniu do przeżycia całkowitego, wolnego od zdarzeń, ryzyka wznowy), a także potrzebę oceny MRD w kontekście obecności mierzalnej choroby resztkowej za pomocą technik molekularnych w tych przypadkach.

Wątpliwości przy lekturze pracy nasuwają rozbieżności co do liczebności ocenianej grupy chorych wynikające z analizy Table S1, strona 49, a także nie uwzględnienie w tekście pracy związku zmian w obrębie genu PTEN ze zmianami w karyotypie (także Table S1, strona 49), szczególnie w kontekście wniosku wynikającego z pierwszej przedstawionej pracy.

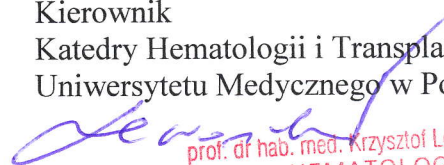
W podsumowaniu, pragnę stwierdzić, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawie doktorskiej i stanowi istotny wkład w badania dotyczące podłoża molekularnego ostrej białaczki limfoblastycznej T-komórkowej.

Jest również bardzo dobrym przykładem właściwie realizowanych badań naukowych.

Pragnę nadmienić, że uwagi dotyczące pracy w żaden sposób nie umniejszają jej bardzo wysokiej wartości.

prof. zw. dr hab. med. Krzysztof Lewandowski

Kierownik
Katedry Hematologii i Transplantacji Szpiku
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu


prof. dr hab. med. Krzysztof Lewandowski
HEMATOLOG
TRANSPLANTOLOG
specjalista chorób wewnętrznych
4779559