

Gliwice, 12.06.2019

Recenzja osiągnięcia naukowego „Ostra białaczka limfoblastyczna u dzieci w ujęciu badań podstawowych i translacyjnych” przedłożonego w postępowaniu habilitacyjnym w dziedzinie - nauk medycznych i nauk o zdrowiu (dyscyplina - nauki medyczne)

Tematem badań dr Małgorzaty Dawidowskiej od wielu lat jest ostra białaczka limfoblastyczna u dzieci, jej aspekty genetyczne i epigenetyczne, z przełożeniem na aplikacje w klinice, takie jak - poszukiwanie nowych czynników prognostycznych i predykcyjnych, markerów wspomagających monitorowanie skuteczności leczenia, indywidualizacja terapii w zależności od indywidualnego profilu molekularnego.

W tym zakresie badań mieści się również osiągnięcie naukowe zatytułowane „Ostra białaczka limfoblastyczna u dzieci w ujęciu badań podstawowych i translacyjnych”, przedstawione jako podstawa do przyznania tytułu doktora habilitowanego.

Dzieło składa się z 5 prac oryginalnych i 1 pracy przeglądowej, opublikowanych w ciągu ostatnich sześciu lat w czasopiśmie z IF (IF pomiędzy 2,3 a 6,6). Łączny IF tego cyklu prac wynosi ponad 27, a więc jest znaczący. Dr Dawidowska jest pierwszym i korespondującym autorem w trzech z nich, a w dwóch - ostatnim i korespondującym. Wskazuje to na przeważający wkład pracy badawczej, jak i na wiodącą rolę w opracowaniu koncepcji większości prac zamieszczonych w tym cyklu.

Ostra białaczka limfoblastyczna (acute lymphoblastic leukemia, ALL), jest dużym problemem klinicznym, gdyż jest to najczęściej rozpoznawany nowotwór u dzieci (rocznie około 250 nowych przypadków). Z drugiej strony, jest to nowotwór, w leczeniu którego dokonał się w ostatnich latach spektakularny postęp. Postęp ten przypisuje się wprowadzeniu indywidualizacji leczenia w zależności od podtypu molekularnego. Badania dr Dawidowskiej mają na celu lepsze poznanie biologii tej heterogennej choroby, znalezienie markerów molekularnych pozwalających na jeszcze bardziej pogłębioną stratyfikację podtypów białaczki i indywidualne dopasowanie schematów terapeutycznych do danego podtypu. Ponadto, z badań tych mogą się wyłonić nowe cele terapeutyczne a także markery pozwalające lepiej monitorować przebieg choroby.

Wyodrębnienie podtypów molekularnych o odrębnym rokowaniu i wskazaniach terapeutycznych jest szczególnie pilne w przypadku podtypu T-ALL, wywodzącego się z prekursorów limfocytów T, dojrzewających w grasicy. Podtyp ten jest rzadszy (ok 15% wszystkich zachorowań), bardziej heterogeny (5 podtypów immunofenotypowych) i słabiej zbadany. Podtyp BCP-ALL (B-cell precursor ALL) powstaje z prekursorów limfocytów B różnicujących w szpiku kostnym i stanowi 85% wszystkich przypadków ALL u dzieci; wyróżnia się trzy podtypy immunofenotypowe BCP-ALL. Habilitantka zajmowała się badaniami obydwu podtypów ALL.

Habilitantka wymienia cztery szczegółowe cele badawcze. Realizacja dwóch pierwszych celów służy lepszemu poznaniu molekularnych mechanizmów związanych z rozwojem białaczki T-ALL. Są to:

1. Identyfikacja mutacji i zmiany liczby kopii genów istotnych dla patogenezy T-ALL, pod kątem ich potencjalnego wykorzystania jako czynniki prognostyczne.
2. Analiza transkryptomu miRNA w podtypie T-ALL, z wykorzystaniem sekwencjonowania nowej generacji (NGS), w celu identyfikacji nowych epigenetycznych mechanizmów patogenezy T-ALL, nowych markerów molekularnych i nowych potencjalnych celów terapeutycznych.

Kolejny cel ma znaczenie metodyczne:

3. Identyfikacja miRNA o stabilnej ekspresji w T-ALL, które mogą być wykorzystane jako endogenne kontrole do normalizacji w analizie wyników z ilościowej reakcji PCR (RT-qPCR).

Czwarte zadanie ma na celu znalezienie nowych markerów do monitorowania skuteczności leczenia:

4. Identyfikacja germinalnych wariantów polimorficznych genów, wykazujących asocjację z obecnością przetrwałych komórek białaczkowych (MRD), jako potencjalnych czynników wspomagające ocenę odpowiedzi na leczenie ALL.

Początek prac, których efekty publikacyjne składają się na cykl habilitacyjny jest związany z realizacją wieloosrodkowego projektu „Wieloparametryczna analiza genetyczna, immunologiczna i molekularna ostrej białaczki limfoblastycznej z komórek prekursorowych limfocytów T (T-ALL) - identyfikacja czynników prognostycznych i poprawa monitorowania efektów leczenia”. Habilitantka pełniła w nim rolę głównego wykonawcy (koordynatora?) w swoim macierzystym ośrodku. W ramach projektu przeprowadzono wstępną analizę oceny częstości występowania mutacji w kilkunastu genach, wytypowanych w oparciu o dane literaturowe.

Efektem tego projektu była praca *Kraszevska MD, et al. Polish Pediatric Leukemia Lymphoma Study Group (PPLLSG). BCL11B, FLT3, NOTCH1 and FBXW7 mutation status in T-cell acute lymphoblastic leukemia patients. Blood Cells Mol Dis. 2013 Jan;50(1):33-8.*

W ramach tych badań zidentyfikowano 9 nowych mutacji: 8 w genie NOTCH1 i jedną w genie BCL11B. Mutacje te zostały zgłoszone do bazy GenBank. W badanej grupie mutacje FLT3 i BCL11B występowały odpowiednio u 3% i u 2% pacjentów. Próbowano ocenić korelację tych mutacji z prognozą u pacjentów leczonych wg. protokołu ALL-IC BFM 2002. Ze względu na małą grupę badanych i krótki czas obserwacji nie udało się potwierdzić takich korelacji. Gen BCL11B koduje czynnik transkrypcyjny istotny dla różnicowania tymocytów. W konkluzji, autorzy zasugerowali, że BCL11B może pełnić rolę onkogeny w rozwoju T-ALL. Częstość mutacji tego genu w T-ALL określa się obecnie na ~10%. Ponieważ mutacje prowadzą do jego inaktywacji, przyjmuje się, że jest on raczej genem supresorowym.

List do redakcji: *Szarzyńska-Zawadzka B, et al. PTEN abnormalities predict poor outcome in children with T-cell acute lymphoblastic leukemia treated according to ALL IC-BFM protocols. Am J Hematol. 2019 Jan 7*, stanowi kontynuację i rozszerzenie badań

przebiegach w opisanym wyżej wieloośrodkowym projekcie. Badaniem objęto większą grupę badaną i dłuższy był czas obserwacji. Praca ta opisuje wyniki obszernej analizy związku mutacji i zmian liczby kopii 23 genów (m.in. *NOTCH1*, *PTEN*, *WT1*, *MYB*) z prognozą.

Do detekcji aberracji genetycznych wykorzystano całe spektrum metod, dopasowanych do poszczególnych genów/zmian: PCR i sekwencjonowanie Sanger; metodę PCR i elektroforezę; metodę HRM (high resolution melt analysis) połączoną z sekwencjonowaniem Sanger. Do oceny liczby kopii określonych genów stosowano metodę MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification), a dla potwierdzenia wyniku – sekwencjonowanie całogenomowe z niską głębokością pokrycia.

Badanie przeprowadzono u dużej grupy - 162 pacjentów z T-ALL. Autorzy wykazali związek aberracji *PTEN* (zarówno mutacji jak i delecji) z gorszą odpowiedzią na leczenie w kontekście protokołu terapeutycznego ALL IC-BFM 2002 i ALL IC-BFM 2009. W szczególności, dzieci z tym aberracjami wykazywały słabą odpowiedź na kortykosteroidy. Autorzy wnioskują, że włączenie badania statusu *PTEN* do algorytmu oceny grupy ryzyka, w połączeniu z oceną minimalnej choroby resztkowej, może poprawić system stratyfikacji pacjentów. Wyniki tych badań wskazują także na zasadność podjęcia badania inhibitorów szlaku PI3K/AKT w leczeniu podgrupy pacjentów.

Najnowszy nurt badań Habilitantki dotyczy roli mikroRNA w rozwoju T-ALL. W pracy Dawidowska M, et al.: *Comprehensive investigation of miRNome identifies novel candidate miRNA-mRNA interactions implicated in T-cell acute lymphoblastic leukemia*. *Neoplasia* 2019 March; 21(3): 294-310, scharakteryzowano za pomocą sekwencjonowania nowej generacji globalną ekspresję mikroRNA w komórkach T-ALL od 34 pacjentów i w 5 próbkach prawidłowych komórek T. Do analizy włączono dodatkowo dane z jedynej podobnej publikacji, dostępne w bazie Gene Expression Omnibus (GEO), powiększając grupę chorych do 82. Analiza danych wykazała, że podtypy T-ALL scharakteryzowane za pomocą technik immunofenotypowych różnią się także na poziomie ekspresji miRNA. Badanie pozwoliło również zidentyfikować nowe miRNA, nie wymieniane dotąd w bazach danych. Porównanie profilu ekspresji miRNA w komórkach T-ALL i w prawidłowych tymocytach pozwoliło wskazać nowe potencjalnie onkogenne klasy miRNA i potencjalnie supresorowe miRNA. Autorzy wykonali obszerną analizę *in silico*, wykorzystując 8 różnych algorytmów do predykcji genów docelowych dla wybranych miRNA. mRNA identyfikowane przez co najmniej 5 algorytmów poddano analizie w poszukiwaniu szlaków sygnałowych, których regulacja może być zmieniona pod wpływem danego zestawu miRNA. Analiza wykazała, że w komórkach T-ALL występuje zmieniona regulacja szlaków związanych z interleukiną 6, mTOR oraz apoptozą. Jest to wskazówka dla zasadności przeprowadzenia badań nad skutecznością inhibitorów mTOR (np. rapamycyna) w leczeniu tych przypadków T-ALL, które są związane z aktywacją ścieżki mTOR. Autorzy przeprowadzili także badania funkcjonalne wybranych miRNA potencjalnie związanych z regulacją apoptozy - hsa-miR-20b-5p i hsa-miR-363-3p i wykazali ich oddziaływanie w regionach 3'UTR genów docelowych. Są to badania nowatorskie, wyniki są oryginalne. Badania przedstawione w tej pracy mają charakter zwiadowczy i z pewnością stanowią podstawę do dalszych pogłębionych analiz.

Problematykę miRNA w białaczkach T-ALL Habilitantka omawia szerzej, razem ze swoimi współpracownikami, w pracy: Drobna M, et al. *T-cell acute lymphoblastic leukemia*

from miRNA perspective: Basic concepts, experimental approaches, and potential biomarkers. Blood Rev. 2018 Nov;32(6):457-472. Praca ukazała się w uznanym czasopiśmie z branży hematologicznej Blood Reviews (IF 6,6).

Z kolei praca: *Drobna M, i wsp. Identification of Endogenous Control miRNAs for RT-qPCR in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. Int J Mol Sci. 2018 Sep 20;19(10). pii: E2858* podejmuje ważny aspekt praktyczny, często pomijany przez badaczy posługujących się techniką ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym - jakim jest odpowiedni dobór stabilnych endogennych kontroli do normalizacji ekspresji badanych genów. Autorzy zidentyfikowali 3 endogenne geny kontrolne (hsa-miR-16-5p, hsa-miR-25-3p, and hsa-let-7a-5p), które zachowują stabilność w szerokim spektrum próbek T-ALL i prawidłowych limfocytów T oraz w liniach komórkowych T-ALL in vitro. Przedstawiona strategia poszukiwania genów kontrolnych może być zastosowana także do innych układów eksperymentalnych.

Ostatnia praca w cyklu habilitacyjnym: *Dawidowska M, et al., Association of germline genetic variants in RFC, IL15 and VDR genes with minimal residual disease in pediatric B-cell precursor ALL. Sci Rep. 2016 Jul 18;6:29427* dotyczy drugiego, częstszego podtypu ALL, BCP-ALL. Grupa badana obejmowała 159 pacjentów pediatrycznych. Oznaczono polimorfizmy w 23 genach i szukano asocjacji z obecnością minimalnej choroby resztkowej (MRD). Zidentyfikowano trzy polimorfizmy w genach związanych z farmakokinetyką i farmakodynamiką leków przeciwbiałaczkowych oraz z antynowotworową odpowiedzią układu odpornościowego, jako istotnie związane z ryzykiem MRD.

Podsumowując, dr Dawidowska przedstawiła cykl prac, które dokumentują nowatorskie badania w zakresie molekularnych mechanizmów leżących u podłoża dziecięcej ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL).

Przeważająca część badań dotyczy podtypu ALL wywodzącego się z prekursorów limfocytów T (T-ALL). T-ALL jest rzadsza niż ALL z prekursorów limfocytów B, słabiej zbadana pod kątem molekularnym i charakteryzuje się gorszymi efektami leczenia.

Podstawą sukcesów badawczych Habilitantki w zakresie T-ALL jest objęcie badaniami możliwie dużych grup pacjentów, a także poszerzenie niektórych badań o dane dostępne w publicznych repozytoriach i przeprowadzenie re-analizy tych danych. Dodatkowym atutem jest zastosowanie najnowszych technik badawczych, takich jak sekwencjonowanie nowej generacji.

Analiza danych z eksperymentów wielkoskalowych została wykonana we współpracy naukowej z wyspecjalizowanym ośrodkiem, jakim jest Politechnika Śląska w Gliwicach. Jest to bardzo poprawne podejście badawcze, gdyż analiza takich danych jest trudna i wymaga doświadczenia; najlepiej się udaje przy dobrej współpracy zespołów obliczeniowych (matematycy, informatycy) i zespołów bio-medycznych, gdyż wymaga z jednej strony – znajomości zaawansowanych metod obliczeniowych, a z drugiej strony - dobrego zrozumienia analizowanych zagadnień.

Na podkreślenie zasługuje staranne podejście do analizy danych z ilościowej reakcji PCR, co przyniosło skutek w postaci odrębnej publikacji dotyczącej metod normalizacji pomiarów ekspresji miRNA. Przypuszczam, że impuls do tych badań wyszedł ze strony współpracującego zespołu bioinformatyków, którzy wcześniej wielokrotnie zetknęli się

z problemem normalizacji takich danych; w niczym to oczywiście nie umniejsza wagi przeprowadzonych wspólnie badań.

Wśród wymiernych efektów prac nad T-ALL należy wymienić odkrycie nowych potencjalnych onkogennych i supresorowych miRNA i objęcie niektórych z nich badaniami funkcjonalnymi; zdefiniowanie szlaków sygnałowych o zmienionej regulacji w T-ALL w porównaniu do prawidłowych komórek T; wykazanie przesłanek do zbadania roli inhibitorów mTOR oraz PI3K/AKT w określonych podtypach molekularnych; wykrycie roli aberracji PTEN w prognozowaniu i przewidywaniu odpowiedzi na określone schematy leczenia; zidentyfikowanie 9 nowych mutacji w genach związanych z etiologią choroby (8 w genie NOTCH1 i jednej w genie BCL11B).

W zakresie badań nad BCP-ALL, Habilitantka jest współautorką badań, które wykazały przydatność oznaczania wariantów genetycznych w genach RFC, IL15 i VDR do detekcji minimalnej choroby resztkowej i oceny ryzyka.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że Autoreferat napisany jest bardzo zwięzłym i precyzyjnym, a równocześnie bardzo poprawnym językiem. Emanuje z niego wrażenie fachowości i dogłębnej znajomości poruszanej tematyki.

Podsumowując - na podstawie oceny przedłożonych mi dokumentów jestem przekonana, że dr Małgorzata Dawidowska jest ekspertem w swojej dziedzinie, potrafi kierować zespołem badawczym, realizuje nowatorskie badania i publikuje ich wyniki w coraz lepszych czasopismach. A zatem, spełnia Ona wymagania stawiane samodzielnym pracownikom naukowym. Stwierdzam, że osiągnięcia dr Dawidowskiej odpowiadają wymaganiom ustawowym stawianym kandydatom do stopnia naukowego doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu (dyscyplina - nauki medyczne).

W związku z powyższym, w pełni popieram wniosek o nadanie stopnia doktora habilitowanego dr Małgorzacie Dawidowskiej.



Dr hab. Katarzyna Lisowska, prof. Instytutu Onkologii