

prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Marzena Anna Lewandowska, MBA
Kierownik Zakładu Genetyki i Onkologii Molekularnej
Centrum Onkologii im. prof. F. Łukaszczyka w Bydgoszczy

Klinika Chirurgii Klatki Piersiowej i Nowotworów
Wydział Lekarski, Collegium Medicum w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr. inż. Michała Walczaka

**pt. „Badania farmakogenetyczne u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna
poddanych terapii anty-TNF”.**

Rozprawa doktorska została zrealizowana w Instytucie Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu pod kierunkiem Pani promotor dr hab. n. med. Marzeny Skrzypczak-Zielińskiej. Praca była realizowana w ramach projektów „Młodzi Naukowcy” Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu oraz ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach grantu SONATA, nr 2016/23/D/NZ2/01620 przyznanej pani Promotor.

Dwadzieścia lat po opublikowaniu pełnej sekwencji genomu człowieka, szczegółowe wyjaśnienie molekularnych mechanizmów chorób genetycznych czy precyzyjne dopasowanie terapii dla konkretnego pacjenta nadal pozostaje wyzwaniem.

Szereg projektów badawczych w dziedzinie genomiki zrewolucjonizował medycynę i biotechnologię. Część zespołów koncentruje się (i) na charakterystyce elementów funkcjonalnych genomu, (ii) inni badacze identyfikują warianty sekwencji nukleotydowej DNA pojedynczych genów, które mogą wpływać na skuteczność terapii, (iii) a zidentyfikowanie nowych translokacji w ramach badań nad genomem raka – precyzuje nowe cele molekularne.

Medycyna personalizowana z wyzwania kart podręczników stała się rzeczywistością w onkologii. Podczas kwalifikacji pacjenta do programów lekowych wymaga się określenia konkretnych genetycznych biomarkerów predykcyjnych w tkance nowotworowej płuca, piersi, jajnika, jelita grubego czy czerniaka. Doskonałym przykładem jest niedrobnokomórkowy rak

płuca, gdzie analiza molekularna genu *EGFR* czy cytogenetyczna analiza rearanżacji genu *ALK* czy *ROS* w komórkach nowotworowych jest obecnie rutynowym badaniem genetycznym. Identyfikacja tych somatycznych zmian pozwala na zastosowanie odpowiednich inhibitorów receptora kinazy tyrozynowej I, II czy III generacji.

O ile badania farmakogenetyczne czy farmakogenomiczne przeżywają swój renesans w onkologii dzięki projektowi sekwencjonowania genomu raka (ang. *The Cancer Genome Atlas*, *TCGA*), to farmakogenetyka w chorobach związanych ze stanem zapalnym, nieprawidłowościami w funkcjonowaniu układu immunologicznego jest nadal eksplorowana i nie ma tak szerokiego przełożenia na procedury medyczne.

Ostatni rok pandemii uwypuklił problem pacjentów z nieswoistymi stanami zapalnymi jelit czy przyjmującymi leki immunosupresyjne. Sprzeczne informacje dotyczące większego vs mniejszego ryzyka zakażenia wirusem SARS-CoV-2 i ciężkiego vs łżejszego przebiegu choroby COVID-19 - wskazują dalszą potrzebę badań zarówno nad patogenezą nieswoistych chorób zapalnych jelit, jak i badań farmakogenomicznych. Poszukiwanie predykcyjnych wariantów genetycznych dla choroby Leśniowskiego-Crohna, w szczególności dla pacjentów poddanych terapii opartych o przeciwciała monoklonalne anty-TNF wydaje się być bezprecedensowo potrzebnym tematem badawczym realizowanym w zespole pani promotor dr hab. n med. Marzeny Skrzypczak-Zielińskiej.

Trafność wyboru tematu rozprawy doktorskiej bezpośrednio odzwierciedla również 5 z 7 artykułów opublikowanych w trakcie przygotowywania doktoratu, które są bezpośrednio związane z tematem dysertacji a doktorant Pan mgr inż. Michał Walczak jest pierwszym bądź drugim współautorem. Tym samym, stwierdzam, że badane zagadnienia przedstawione w rozprawie są aktualnym tematem badawczym a wyniki przedstawione w rozprawie są pożądane nie tylko w aspekcie naukowym ale również aplikacji klinicznej.

Przedstawiona rozprawa zawiera 111 stron wydruku komputerowego, z podziałem na 11 rozdziałów, z których najważniejszymi, moim zdaniem są: wstęp, cel pracy doktorskiej, materiały i metody, wyniki, dyskusja i podsumowanie z wnioskami końcowymi, piśmiennictwo. Rozprawa doktorska zawiera 14 rycin, 17 tabel, a dobór piśmiennictwa i jego aktualność nie budzi zastrzeżeń.

WSTĘP: w pierwszej części rozprawy zawarta została etiologia, patomechanizm oraz terapia choroby Leśniowskiego-Crohna i brak odpowiedzi na leczenie przeciwciałami anty-TNF. W sposób szczegółowy opisano mediatory braku odpowiedzi na leczenie anty-TNF, interleukiny, metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej czy białka z rodziny S100. Autor

wyjaśnia pojęcie medycyny personalizowanej i znaczenia badań farmakogenetycznych w tym badań z użyciem wysokoprzepustowych narzędzi biologii molekularnych, jak NGS.

Doktorant jasno określił HIPOTEZĘ BADAWCZĄ i następujące 4 cele badawcze: (1) zaprojektowanie, optymalizacje bibliotek oraz identyfikację wariantów genetycznych uczestniczących w działaniu TNFa przy użyciu sekwencjonowania nowej generacji (2) identyfikację profili ekspresji wybranych genów w zależności od odpowiedzi na leczenie anty-TNF (3) analizę wpływu przeciwciał anty-TNF na apoptozę limfocytów T oraz (4) analizę funkcjonalną.

MATERIAŁY i METODY: Doktorant w sposób szczegółowy opisał metodologię na 25 stronach, dodatkowo uzupełniając 13 tabelami. Materiał do badań pochodził od pacjentów zdiagnozowanych z chorobą Leśniowskiego-Crohna i został pozyskany przy współpracy z Uniwersytetem Medycznym im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. Grupy badane oraz metody zostały prawidłowo wybrane.

Pan mgr inż. Michał Walczak opanował zarówno metody biologii molekularnej i biologii komórki: zaprojektował i zoptymalizował startery, wykorzystał Long Range PCR celem wzbogacenia analizowanej sekwencji, poddał badane DNA analizie z wykorzystaniem PCR w czasie rzeczywistym, sekwencjonowaniu kapilarnemu i sekwencjonowaniu nowej generacji łącznie z analizami bioinformatycznymi, po prowadzenie hodowli komórkowych *in vitro*, testy cytotoksyczności i cytometrię przepływową. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że Doktorant korzystał z różnych repozytoriów, baz danych i platform bioinformatycznych szczegółowo wymienionych w podrozdziale 5.5.13. Nie ograniczył się tylko do prostych analiz *Indel* czy polimorfizmów pojedynczego nukleotydu, ale poszerzył analizy bioinformatyczne o ocenę funkcjonalności wariantów istotnych statystycznie.

Rozdział WYNIKI zawiera 16 stron opisu, 2 tabele i 11 rycin. Przejrzysta i logiczna prezentacja wyników rzutuje pozytywnie na całość rozprawy doktorskiej. Wyniki zostały zaprezentowane przy pomocy bogactwa różnych form: tabel, wykresów (np. parametry kliniczne, dokładność sekwencjonowania, ocena cytotoksyczności), map cieplnych (częstości występowania genotypów), schematów (nierównowagi sprzężeń polimorfizmów). Staranna selekcja grupy badanej, dbałość o zabezpieczenie różnego materiału do badań (np. krew, biopiat z błony śluzowej jelita cienkiego – tkanka ze stanem zapalnym vs tkanka zdrowa), przygotowanie autorskiego panelu genów z optymalizacją bibliotek do analiz techniką NGS, to tylko niektóre przykłady wskazujące z jaką dbałością została zaplanowana praca badawcza.

Szczegółowe opisy punktów kontrolnych sekwencjonowania nowej generacji, kontrolna walidacja wyników NGS poprzez zastosowanie sekwencjonowania kapilarnego, analiza asocjacji zidentyfikowanych wariantów i funkcjonalne analizy *in silico* z identyfikacją miRNA, które potencjalnie wiążą się w miejscu zidentyfikowanego polimorfizmu są przykładem dużej staranności i rzetelności naukowej.

Za najważniejsze wyniki rozprawy doktorskiej uznaje:

- 1) zaprojektowanie i zoptymalizowanie panelu 23 genów oraz analizę genetyczną z wykorzystaniem wysokoprzepustowej technologii w zakresie badań farmakogenetycznych u pacjentów zdiagnozowanych z chorobą Leśniowskiego-Crohna poddanych terapii anty-TNF.
- 2) analizę ekspresji genów: *FCGR3A*, *TNFRSF1B*, *ADAM17*, *IL1B* na materiale tkankowym od pacjentów nieodpowiadających versus odpowiadających na leczenie i grupą kontrolną.
- 3) charakterystykę zidentyfikowanych zmian oraz wstępną analizę wpływu badanych polimorfizmów na ekspresję mRNA

DYSKUSJA: W dyskusji Pan mgr inż. Michał Walczak umiejętnie konfrontuje wyniki swoich prac z wynikami dostępnymi w światowej anglojęzycznej literaturze. Z niezwykłą przyjemnością czytałam dyskusję rozprawy, w której Doktorant jest świadomy ograniczeń podczas przeprowadzonych badań, a z drugiej strony dalekowzrocznie ocenia wpływ zidentyfikowanych substytucji na różne etapy obróbki RNA: od transkrypcji, składania genów po stabilność mRNA. Kandydat stawia nowe hipotezy badawcze i kreśli nowe możliwości badań. Dyskutuje nad molekularnymi mechanizmami działania leków biologicznych i potencjalnymi dalszymi badaniami, które by pomogły rozszerzyć wiedzę o zakres aplikacyjny. Uzyskane wyniki nie dają jednoznacznej odpowiedzi czy geny badane w niniejszej rozprawie bezpośrednio przyczyniają się do modyfikacji działania leczenia biologicznego u pacjentów nieodpowiadających na terapię przeciwciałami anty-TNF. Niemniej jednak zdobyta wiedza w zakresie genotyp:odpowiedź na leczenie u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna przybliżyła nas w kierunku medycyny personalizowanej.

Rozprawę doktorską kończy PODSUMOWANIE WYNIKÓW i poprawnie sformułowane WNIOSKI KOŃCOWE, które są odpowiedziami na wcześniej sformułowane hipotezy badawcze i zaplanowane cele. Dalej rozprawa doktorska zawiera 165 pozycji

Szczegółowe opisy punktów kontrolnych sekwencjonowania nowej generacji, kontrolna walidacja wyników NGS poprzez zastosowanie sekwencjonowania kapilarnego, analiza asocjacji zidentyfikowanych wariantów i funkcjonalne analizy *in silico* z identyfikacją miRNA, które potencjalnie wiążą się w miejscu zidentyfikowanego polimorfizmu są przykładem dużej staranności i rzetelności naukowej.

Za najważniejsze wyniki rozprawy doktorskiej uznaję:

- 1) zaprojektowanie i zoptymalizowanie panelu 23 genów oraz analizę genetyczną z wykorzystaniem wysokoprzepustowej technologii w zakresie badań farmakogenetycznych u pacjentów zdiagnozowanych z chorobą Leśniowskiego-Crohna poddanych terapii anty-TNF.
- 2) analizę ekspresji genów: *FCGR3A*, *TNFRSF1B*, *ADAM17*, *IL1B* na materiale tkankowym od pacjentów nieodpowiadających versus odpowiadających na leczenie i grupą kontrolną.
- 3) charakterystykę zidentyfikowanych zmian oraz wstępną analizę wpływu badanych polimorfizmów na ekspresję mRNA

DYSKUSJA: W dyskusji Pan mgr inż. Michał Walczak umiejętnie konfrontuje wyniki swoich prac z wynikami dostępnymi w światowej anglojęzycznej literaturze. Z niezwykłą przyjemnością czytałam dyskusję rozprawy, w której Doktorant jest świadomy ograniczeń podczas przeprowadzonych badań, a z drugiej strony dalekowzrocznie ocenia wpływ zidentyfikowanych substytucji na różne etapy obróbki RNA: od transkrypcji, składania genów po stabilność mRNA. Kandydat stawia nowe hipotezy badawcze i kreśli nowe możliwości badań. Dyskutuje nad molekularnymi mechanizmami działania leków biologicznych i potencjalnymi dalszymi badaniami, które by pomogły rozszerzyć wiedzę o zakres aplikacyjny. Uzyskane wyniki nie dają jednoznacznej odpowiedzi czy geny badane w niniejszej rozprawie bezpośrednio przyczyniają się do modyfikacji działania leczenia biologicznego u pacjentów nieodpowiadających na terapię przeciwciałami anty-TNF. Niemniej jednak zdobyta wiedza w zakresie genotyp:odpowiedź na leczenie u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna przybliżyła nas w kierunku medycyny personalizowanej.

Rozprawę doktorską kończy PODSUMOWANIE WYNIKÓW i poprawnie sformułowane WNIOSKI KOŃCOWE, które są odpowiedziami na wcześniej sformułowane hipotezy badawcze i zaplanowane cele. Dalej rozprawa doktorska zawiera 165 pozycji

literaturowych, z których 67% (111 artykułów naukowych) zostało opublikowanych w ostatnich 10 latach.

Tekst rozprawy został napisany poprawnie z bardzo dużą dbałością o język ojczysty, choć nie uchronił się od pojedynczych niedociągnięć:

- pojedyncze błędy interpunkcyjne (np. str. 63. Rozdział 5.5.1.) i literówkowe (np. str. 98. Jest „reguluje” powinno być „reguluje” ;
- nieścisłości w tłumaczeniu (np. str. 92)
jest: wycinanie intronów (*ang. splicing*);
powinno być albo: wycinanie intronów (*ang. intron excision*);
albo: „składanie genów” (*ang. splicing*”).
- w rozdziale 5: Materiał i Metody brakuje krótkiego opisu, na podstawie jakich parametrów Doktorant wybrał 23 geny do badań NGS. Można przypuszczać, że wybór był na podstawie informacji o funkcjach i znaczeniu aktywności TNF α zawartych w Tabeli 1 z Rozdziału 3 Wstęp, ale krótki paragraf o kwalifikacji genów do panelu badawczego ułatwiłby lekturę rozprawy.
- Bibliografia, pozycja 78 str. 27 oraz str. 89– „wariant ten (rs. 396991) ma duże znaczenie w terapii przeciwnowotworowej”. Cytowana publikacja jest pracą przeglądową napisaną w j. polskim; należałoby się odnieść do konkretnych prac badawczych a nie przeglądowych, tym bardziej że prognostyczna, jak i predykcyjna rola rs. 396991 jest również dyskusyjna w chorobach nowotworowych. Polimorfizm rs. 396991 w genie *FCGR3A* nie wykazał żadnego istotnego związku z przeżyciem wolnym od progresji lub przeżyciem całkowitym, ani z odpowiedzią na przeciwciała monoklonalne u pacjentów zdiagnozowanych z rakiem jelita grubego czy chłoniakiem grudkowym.

Lektura rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Michała Walczaka była bardzo interesująca i skłoniła mnie do zadania kilku pytań o charakterze dyskusyjnym, z prośbą o odpowiedzi w trakcie publicznej obrony:

- 1) Dotychczas opublikowane w bazie danych ClinVar i dsSNP warianty genu *FCGR3A* o potencjalnym znaczeniu klinicznym są zmianami synonimicznymi i niesynonimicznymi (min. zmiany sensu). Doktorant elegancko przeprowadził bioinformatyczną analizę funkcjonalną wariantów, zidentyfikowanych w intronach oraz analizę *in silico* występowania miejsc wiązania dla miRNA z wykorzystaniem

baz danych miRdSNP oraz TargetScanHuman. Czy Kandydat również sprawdzał czy badane warianty zidentyfikowane w intronach mogą być zlokalizowane w sekwencjach regulatorowych wpływających na prawidłowe składanie genu, takich jak ISE (ang. *intronic splicing enhancer*) lub zmieniają sekwencję do której przyłączają się czynniki transkrypcyjne i czy mogłoby to zmienić wzór ekspresji badanych genów?

- 2) Doktorant ogólnie opisuje geny referencyjne w metodologii i wynikach. Proszę o doprecyzowanie, zwłaszcza w części „Wyniki” opisu relatywnego poziomu ekspresji z użyciem genów referencyjnych *PPIA* i *RPLP0*.
- 3) Biorąc pod uwagę doświadczenie nabyte podczas pracy badawczej - proszę Doktoranta o ocenę potencjału aplikacyjnego zaprojektowanego panelu farmakogenetycznego obejmującego 23 geny zaangażowane w działanie TNF α . Czy Doktorant powtórzyłby wybór tych samych genów dla badanych pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna? Czy dziś Doktorant mając fundusze i potencjalnie większe możliwości użyłby tej samej technologii czy rozszerzyłby badania nad zmienną ekspresją wybranych genów lub wybrałby analizę transkryptomu? Istnieją na rynku testy diagnostyczne z wykorzystaniem ekspresji genów na materiale tkankowym zaakceptowane przez amerykańską FDA. Czy Doktorant rozważa przyszły kierunek pracy badawczej w zakresie medycyny translacyjnej i diagnostycznych testów predykcyjnych na materiale tkankowym? Czy ze względu na trudność w pozyskiwaniu tego materiału Doktorant przewiduje inny kierunek badań farmakogenetycznych u pacjentów zdiagnozowanych z chorobą Leśniowskiego-Crohna; lub inną ścieżkę potencjalnych aplikacji medycznych?

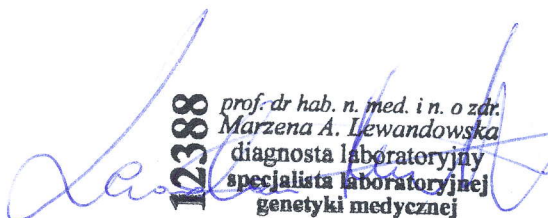
Podsumowując swoją opinię o rozprawie doktorskiej, chciałabym jednoznacznie stwierdzić, że bardzo wysoko oceniam jej poziom naukowy. Opublikowane wyniki prac znacząco poszerzają wiedzę w zakresie badań farmakogenetycznych. Połączenie wiedzy biologii komórki i genetyki molekularnej oraz kliniki z szerokim wachlarzem technik zarówno eksperymentalnych, jak i „in silico” świadczą, że doktorant Pan mgr inż. Michał Walczak jest doświadczonym naukowcem. Potwierdza to udział Kandydata w 3 projektach naukowych, w 2 jako wykonawca projektu INNOMED, ONKOKAN NCBiR oraz SONATA, NCN a w jednym jako kierownik projektu - grant dla młodych finansowane z MNiSW. Na szczególną uwagę

zasługuje również nie tylko umiejętność współpracy w grantach badawczych, ale również staże i kursy międzynarodowe („Biotechnologia w przemyśle”, Pekin, Chińska Republika Ludowa). Świadczy to zarówno o znakomitej relacji naukowej promotor-doktorant, dzięki której możliwe było przez promotora odkrywanie i rozwijanie potencjału Doktoranta, a w późniejszych latach – nabyciu dojrzałości naukowej Doktoranta. Tę samodzielność, dojrzałość Doktoranta i umiejętność pracy zespołowej w grantach badawczych dodatkowo poświadczają prace opublikowane w międzynarodowych czasopismach o współczynniku oddziaływania IF=21.511.

Wniosek końcowy:

Przedstawiona do oceny rozprawa pod tytułem „Badania farmakogenetyczne u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna poddanych terapii anti-TNF” na stopień naukowy doktora nauk medycznych spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz 1669 z późn. zm.). Zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu o nadanie mgr. inż. Michałowi Walczakowi stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Mając na uwadze wysoką jakość i użyteczność badań, podjęcie się tematu o dużej trudności interpretacyjnej łączącej zarówno nauki podstawowe, jak i kliniczne, unikalność tychże badań i interesujące wyniki - jednocześnie zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.


12388 prof. dr hab. n. med. i n. o zdr.
Marzena A. Lewandowska
diagnosta laboratoryjny
specjalista laboratoryjnej
genetyki medycznej

Bydgoszcz, 29.04.2021 r.