



Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

Katedra Hematologii i Transplantacji Szpiku

KIEROWNIK: prof. zw. dr hab. Krzysztof Lewandowski

60-569 Poznań, ul. Szamarzewskiego 84 ; tel. 061 854 93 83/ fax : 0 61 854 93 56

e-mail: lewandowski@ump.edu.pl; sekretariat: e-mail: jadwiga.dworek@skpp.edu.poznan.pl

Recenzja pracy na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu mgr Moniki Drobnej-Śledzińskiej
„Identyfikacja interakcji miRNA-mRNA w patogenezie dziecięcej T-komórkowej ostrej białaczki
limfoblastycznej (T-ALL)”

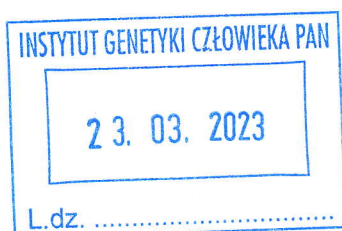
Mgr Monika Drobna-Śledzińska jest absolwentką studiów magisterskich na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu (Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii Studia inżynierskie, kierunek: Biotechnologia), które ukończyła w 2016 roku. W tym samym roku uzyskała tytuł magistra Biotechnologii przedstawiając wyniki pracy „Ocena efektywności biofunkcjonalizowanych nanocząstek in vitro”.

05 marca 2019 roku rozpoczęła prace w ramach studiów doktoranckich w Instytucie Genetyki Człowieka PAN realizując temat badawczy „Identyfikacja nowych interakcji miRNA-mRNA w patogenezie pediatrycznej T-komórkowej ostrej białaczki limfoblastycznej (T-ALL)” pod opieką promotora dr hab. Małgorzaty Dawidowskiej (Instytut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu).

W okresie studiów doktoranckich była kierownikiem oraz wykonawcą 4 grantów naukowych (Grant PRELUDIUM nr 2017/25/N/NZ2/01132 przyznany przez Narodowe Centrum Nauki Tytuł: „Identyfikacja nowych onkogennych/supresorowych interakcji miRNA-mRNA w patogenezie pediatrycznej T-komórkowej ostrej białaczki limfoblastycznej (T-ALL) (Kierownik), grant STRATEGMED nr STRATEGMED3/304586/5/NCBR/2017 przyznany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju Tytuł: „Personalizacja leczenia ostrej białaczki limfoblastycznej u dzieci w Polsce (PersonALL) (wykonawca), grant OPUS nr 2014/15/B/NZ2/03394 przyznany przez Narodowe Centrum Nauki Tytuł: „Sekwencjonowanie nowej generacji transkryptomu miRNA i badania funkcjonalne in vitro w celu poznania patomechanizmów i heterogenności dziecięcej ostrej białaczki limfoblastycznej z limfocytów T (T-ALL)” (wykonawca), projekt Twinning nr 952304 przyznany przez Komisję Europejską w ramach programu Horyzont 2020 Tytuł: „Next Level - On the road to excellence in unravelling the (epi)genetic landscape of hematologic neoplasms” (doradca merytoryczny ds. tworzenia treści popularyzatorskich na portale społecznościowe).

Mgr Monika Drobna-Śledzińska jest autorką 15 prac naukowych o łącznym współczynniku wpływu 55,781 pkt. Czynnie uczestniczyła w zjazdach naukowych (European School of Hematology, European Hematology Association, American Society of Hematology) prezentując wyniki swoich prac badawczych.

Mgr Monika Drobna-Śledzińska była kilkakrotnie nagrodzona/wyróżniona za prowadzone badania naukowe, w tym Nagrodą Miasta Poznania za wyróżniającą się pracę magisterską; za najlepszą pracę naukową opublikowaną w 2018 r. w ramach VI Konkursu Poznańskiego Oddziału PAN, a także Nagrodą „Stypendium dla młodych badaczy z poznańskiego środowiska naukowego” przyznawaną przez Urząd Miasta Poznania.



Recenzja pracy na stopień doktora nauk przyrodniczych

Przedstawioną do recenzji pracę doktorską stanowi 5 prac oryginalnych (sumaryczny Impact Factor 23.91 punktów, stan z dnia 01.02.2023, wg bazy Web of Science Core Collection) poprzedzonych rozbudowanym wstępem (str. 11-23) oraz w każdym przypadku wstępem (prace 1-5), omówieniem uzyskanych wyników i wnioskami z przeprowadzonych badań (prace 2-5).

Całość pracy wraz z załączonymi wersjami publikacji naukowych będących przedmiotem rozprawy wraz z oświadczeniami współautorów prac o ich wkładzie w przeprowadzone badania naukowe przedstawiono na stronach 1-184.

Prace omówiono i przedstawiono zgodnie z założonymi celami badawczymi:

1. Przegląd dostępnej literatury naukowej na temat roli miRNA w biologii nowotworów hematologicznych, w tym T-ALL (publikacja 1).
2. Identyfikację miRNA ulegających nieprawidłowej ekspresji w T-ALL, o potencjalnym znaczeniu onkogennym lub supresorowym w patogenezie tej choroby, na podstawie wyników sekwencjonowania transkryptomu miRNA oraz bioinformatycznej predykcji potencjalnych genów docelowych dla miRNA ulegających nieprawidłowej ekspresji (publikacja 2).
3. Opracowanie strategii identyfikacji miRNA służących jako optymalne endogenne normalizatory do profilowania ekspresji miRNA w białaczce T-ALL metodą RT-qPCR (ang. reverse transcription quantitative polymerase chain reaction) (publikacja 3).
4. Zbadanie wpływu wybranych miRNA na wzrost i żywotność linii komórkowych T-ALL in vitro oraz zbadanie wpływu wybranych miRNA na poziom ekspresji potencjalnych genów docelowych, wytypowanych poprzez predykcję bioinformatyczną (publikacja 4).
5. Zbadanie wpływu wybranego miRNA na globalną ekspresję genów w liniach komórkowych T-ALL na poziomie transkryptomu oraz proteomu (publikacja 5).

Recenzja szczegółowa

Praca 1: Drobna M, Szarzyńska-Zawadzka B, Dawidowska M. T-cell acute lymphoblastic leukemia from miRNA perspective: Basic concepts, experimental approaches, and potential biomarkers. Blood Rev. 2018 Nov;32(6):457-472. doi: 10.1016/j.blre.2018.04.003. Epub 2018 Apr 12. PMID: 29703513.

W pracy przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat częstości występowania zaburzeń genetycznych w ostrej białaczce limfoblastycznej T-komórkowej w populacji pediatrycznej, ze szczególnym uwzględnieniem roli zaburzeń ekspresji mikroRNA w komórkach białaczkowych. W pracy omówiono nie tylko zmiany w profilu ekspresji poszczególnych miRNA, ale także możliwe mechanizmy interakcji miRNA-mRNA, w tym mechanizm w którym pojedyncze miRNA może regulować ekspresję zarówno onkogenów jak i genów supresorowych wzrostu. Świadczy to o dużym zrozumieniu poruszanej problematyki przez Autorkę pracy. Dużą część omawianej pracy stanowi omówienie technik badawczych stosowanych przy ocenie wzajemnych interakcji miRNA-mRNA (dual Luciferase reporter assay, badania funkcjonalne in vivo oraz in vitro), w tym ocenie ekspresji genów techniką qRT-PCR oraz microarray, rozpoznanie przewidywanych celów i szlaków komórkowych docelowych dla poszczególnych interakcji miRNA-mRNA poprzez analizę zareportowanych

wyników badań innych autorów w miR-ecords, miRTarBase, DIANA TsarBase z zastosowaniem narzędzi informatycznych [Over-representation Analysis/Enrichment Analysis (ORA), Functional class scoring (FCS) oraz Pathway Topology (PT)].

W dalszej części pracy Autorka przedstawiła aktualny stan wiedzy na temat roli poszczególnych miRNA w patogenezie T-ALL, w tym onkogennych wchodzących w skład klastra miR-17-92, a także wpływających na supresję wzrostu guza (m.in. miR-451, miR-193b-3p, miR-30).

Bardzo ciekawym wątkiem ocenianej pracy poglądowej wchodzącej w skład pracy doktorskiej jest rola miRNA (miR-142-3p, miR-100, miR-99a) w procesie oporności na leki stosowane w terapii T-ALL, a także przeprowadzona ocena wartości profilu miRnome w diagnostyce różnicowej T-ALL, a szczególnie jej odróżnieniu od innych typów ALL i ostrej białaczki szpikowej. Pracę kończy stwierdzenie, ostrzeżenie że interpretacja wyników oceny ekspresji poszczególnych miRNA w komórkach białaczkowych, powinna podlegać szeregu restrykcyjnym wymogom walidacyjnym i interpretacyjnym przed ich ewentualną aplikacją praktyczną w diagnostyce i leczeniu T-ALL.

Uwagi:

w bardzo szczegółowo przeprowadzonej analizie roli poszczególnych w onkogenezie zabrakło przedstawienia roli miRNA (miR-150, miR-181a, miR-185) w procesie fizjologicznej regulacji limfopojezy T. Dane te pomogły by w lepszym zrozumieniu procesu transformacji nowotworowej limfocyta T.

Praca 2: Dawidowska M, Jaksik R, Drobną M, Szarzyńska-Zawadzka B, Kosmalska M, Sędek Ł, Machowska L, Lalik A, Lejman M, Ussowicz M, Kałwak K, Kowalczyk JR, Szczepański T, Witt M. Comprehensive Investigation of miRNome Identifies Novel Candidate miRNA-mRNA Interactions Implicated in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Neoplasia*. 2019 Mar;21(3):294-310. doi: 10.1016/j.neo.2019.01.004

Praca jest ciekawą analizą profilu ekspresji miRNA (miRNome) w komórkach T, z próbą analizy różnicowej pomiędzy profilami miRNA w komórkach T-ALL i prawidłowych limfocytach T. Grupę badaną stanowiło 34 chorych z pediatryczną postacią T-ALL oraz 5 zdrowych osób <18 roku życia. Niezależną częścią pracy była próba identyfikacji genów docelowych dla zidentyfikowanych miRNA o zdecydowanie odmiennej ekspresji w komórkach T-ALL oraz prawidłowych limfocytach T. Zadanie to zrealizowano przy użyciu następujących narzędzi predykcyjnych: DIANA-microT, EIMMO, MicroCosm, miRanda, miRDB, PicTar, PITA oraz TargetScan, zebranych dzięki multiMiR Bioconductor library. Analiza ta pozwoliła na identyfikację 61 miRNA o istotnie zmienionej ekspresji w komórkach T-ALL w porównaniu do kontroli, w tym 23 miRNA o podwyższonej ekspresji i 38 miRNA o obniżonej ekspresji. Rezultaty te mają charakter nowatorski, ponieważ jedynie niewielka część z nich została wcześniej opisana w literaturze jako miRNA o roli onkogennej. Interesującym wynikiem przeprowadzonych badań było także wykazanie in silico, że wśród miRNA o podwyższonej ekspresji znajdowały się te o dużym potencjale supresorowym wobec genów pozytywnie regulujących proces apoptozy. Może to potwierdzać ich rolę w hamowaniu procesu apoptozy komórek T-ALL.

W pracy podjęto także udaną próbę walidacji in vitro interakcji pomiędzy hsa-miR-20b-5p i hasa-miR-363-3p oraz odpowiednio genami PTEN i SOS1 oraz PTEN i LATS2.

Zastosowana metodologia prowadzonych badań, sposób oceny uzyskanych wyników w recenzowanej pracy potwierdzają duże umiejętności laboratoryjne i analityczne Doktorantki.

Pytania:

Pytanie 1.

Wśród ocenianych chorych znaczną przewagę stanowiły osoby płci męskiej oraz pacjenci z leukocytozą $>20.0\text{G/L}$. Czy wymienione zmienne mogły mieć wpływ na uzyskane wyniki? (dotyczy to szczególnie badania cluster miR-106a-363 zlokalizowanego na chr.Xq26.2). Z jakiego powodu podobnej oceny nie przeprowadzono także w próbkach pozyskanych z krwi obwodowej (obawa przed domieszką „prawidłowych” limfocytów T?)

Pytanie 2.

W badaniach wykorzystywano komórki pobrane z szpiku, a komórki T-ALL pozyskiwano metodą negatywnej selekcji immunomagnetycznej. Jaki odsetek komórek jądrzastych w próbkach pozyskiwanych tą metodą stanowiły komórki T-ALL? Czy od osób zdrowych udało się pozyskać wystarczającą liczbę limfocytów T ze szpiku. Wiadomo bowiem, że u dorosłych osób zdrowych zawartość limfocytów T w szpiku jest niewielka.

Pytanie 3. w oparciu o jakie przesłanki/metodę dokonano wyboru 3 genów pozytywnie zaangażowanych w regulację procesu apoptozy komórek T-ALL, potencjalnie docelowych dla hsa-miR-20b-5p i/lub hsa-miR-363-3p?

Praca 3: Drobna M, Szarzyńska-Zawadzka B, Dąca-Roszak P, Kosmalska M, Jaksik R, Witt M, Dawidowska M. Identification of Endogenous Control miRNAs for RT-qPCR in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. Int J Mol Sci. 2018 Sep 20;19(10):2858. doi: 10.3390/ijms19102858

W badaniach wykorzystano wyniki sekwencjonowania transkryptomu miRNA uzyskane w ramach pracy ocenianej uprzednio. W celu zmniejszenia ryzyka błędnej interpretacji rezultatów badań ekspresji miRNA w procesie oceny uzyskanych wyników wykorzystano analizę interakcyjną. Mając na względzie identyfikację wiarygodnego normalizatora w procesie analizy wyników RT-qPCR postanowiono udzielić odpowiedzi na następujące pytania: 1. Które z wybranych 10 miRNA wykazują stabilny, wysoki poziom ekspresji w limfocytach we wszystkich ocenianych próbkach biologicznych (komórki pediatrycznej T-ALL, prawidłowe limfocyty T szpiku, komórki linii komórkowych T-ALL, prawidłowe tymocyty), oraz 2. Jaka jest minimalna ilość miRNA niezbędna do poprawnej analizy wyników RT-qPCR w przypadku badania ekspresji miRNA w komórkach z linii T. W wyniku przeprowadzonych badań z zastosowaniem miRNA-seq Doktorantka zidentyfikowała 3 endogenne miRNA (hsa-miR-128-3p, hsa-miR-181a-5p i hsa-miR-20b-5p) jako potencjalnie użyteczne w procesie normalizacji wyników ekspresji miRNA w T-ALL. Praca jest przykładem dobrze zaplanowanego eksperymentu naukowego. W opinii Recenzenta wyniki tej pracy mogą znaleźć szerokie zastosowanie praktyczne w ocenie ekspresji genów miRNA w limfocytach/limfoblastach T.

Praca 4: Drobna M, Szarzyńska B, Jaksik R, Sędek Ł, Kuchmiy A, Taghon T, Van Vlierberghe P, Szczepański T, Witt M, Dawidowska M. hsa-miR-20b-5p and hsa-miR-363-3p Affect Expression of *PTEN* and *BIM* Tumor Suppressor Genes and Modulate Survival of T-ALL Cells In Vitro. *Cells*. 2020 May 5;9(5):1137. doi: 10.3390/cells9051137

Praca jest kontynuacją wyników badań uzyskanych uprzednio, dotyczących oceny zależności pomiędzy ekspresją poszczególnych miR a ekspresją genów modulujących przeżycie komórek T-ALL. W pierwszym etapie badań Doktorantka przeprowadziła walidację ekspresji hsa-miR-20b-5p oraz hsa-miR-363-3p metodą RT-qPCT zgodnie z metodyką zaprezentowaną uprzednio, potwierdzając podwyższoną ekspresję hsa-miR-20b-5p i hsa-miR-363-3p w komórkach T-ALL względem ich ekspresji w prawidłowych limfocytach T. Do dalszych badań funkcjonalnych Doktorantka wytypowała 2 linie komórkowe T-ALL, DND-41 i CCRF-CEM, o odpowiednio bardzo wysokiej i stosunkowo niskiej ekspresji hsa-miR-363-3p. Obie linie charakteryzowała wysoka ekspresja hsa-miR-20b-5p i 7 genów kandydatów potencjalnie zaangażowanych w proces pozytywnej regulacji apoptozy komórek T. W każdym przypadku Doktorantka potwierdziła związek pomiędzy sekwencją 3'UTR badanych genów a badanymi miRNA za pomocą testu reporterowego podwójnej lucyferazy. Rezultatem tej oceny było wytypowanie 4 genów (*PTEN*, *BIM* (ang. BCL2 like 11), *SOS1* (ang. SOS Ras/Rac guanine nucleotide exchange factor 1) oraz *FBXW7*) do dalszych badań nad oceną związku pomiędzy poziomem ekspresji hsa-miR-20b-5p i hsa-miR-363-3p a ich ekspresją. Przyjęta strategia postępowania pozwoliła na potwierdzenie przez Doktorantkę zależności pomiędzy wysoką ekspresją hsa-miR-20b-5p i hsa-miR-363-3p a obniżoną ekspresją genów docelowych *PTEN* i *BIM* w liniach komórkowych T-ALL. Dodatkowym potwierdzeniem znaczenia zakłóconej ekspresji badanych miRNA było wykazanie pozytywnego związku pomiędzy ich wysoką ekspresją a wzrostem/żywnością komórek T-ALL.

Przeprowadzone badania mają duże znaczenie praktyczne dla celów opracowania w przyszłości terapii celowanej w T-ALL, szczególnie w kontekście wykazania przez Doktorantkę że równoczesna inhibicja obydwu zidentyfikowanych miRNA powoduje silniejsze spowolnienie wzrostu komórek T-ALL niż inhibicja każdego z nich z osobna. Na wyróżnienie również zasługuje fakt, że uzyskane wyniki w zakresie zależności pomiędzy hsa-miR-20b-5p i hsa-miR-363-3p a obniżoną ekspresją genów docelowych *PTEN* i *BIM* nie były dotychczas raportowane.

Praca 5: Drobna-Śledzińska M, Maćkowska-Maślak N, Jaksik R, Kosmańska M, Szarzyńska B, Lejman M, Sędek Ł, Szczepański T, Taghon T, Van Vlierberghe P, Witt M, Dawidowska M. Multiomics to investigate the mechanisms contributing to repression of *PTPRC* and *SOCS2* in pediatric T-ALL: Focus on miR-363-3p and promoter methylation. *Genes Chromosomes Cancer*. 2022 Dec;61(12):720-733. doi: 10.1002/gcc.23085

Praca stanowi kontynuację uprzednio uzyskanych wyników badań. Jest także próbą bardziej ogólnego spojrzenia na wpływ miRNA na proces ekspresji genów w pediatrycznej postaci T-ALL poprzez zastosowanie analizy multiomicznej. Analizie poddano wpływ hsa-miR-363-3p na globalny profil ekspresji genów poprzez zastosowanie metod transkryptomicznych (metoda RNA-seq) oraz proteomicznych (metoda spektrometrii mas). Badania przeprowadzono na dwóch liniach komórkowych T-ALL (DND-41 oraz ALL-SIL) o wysokiej

endogennej ekspresji hsa-miR-363-3p. W pierwszym etapie dokonano oceny odmiennej ekspresji cząsteczek mRNA/białek w komórkach linii komórkowej DND-41 poddanych stabilnej inhibicji hsa-miR-363-3p (transdukcja wektorem miRZip miR-363-3p). W następnym kroku dokonano oceny wpływu wyciszenia hsa-miR-363-3p na profil ekspresji komórkowej mRNA oraz białek identyfikując tym samym potencjalne cele dla hsa-miR-363-3p (z następową analizą nadreprezentacji). Umożliwiło to identyfikację 138 potencjalnych genów docelowych dla hsa-miR-363-3p (19 z nich o obniżonym poziomie ekspresji w komórkach dziecięcej T-ALL w porównaniu do prawidłowych prekursorów komórek T).

W wyniku analizy danych literaturowych przeprowadzonej przez Doktorantkę do dalszych badań wytypowano gen PTPRC (ang. Protein tyrosine phosphatase receptor type C), kodujący białko receptorowe o aktywności fosfatazy tyrozynowej (CD45), negatywnie regulujące aktywność kinaz JAK i szlaku JAK-STAT. Należy nadmienić, że ścieżka JAK-STAT jak też inne ścieżki sygnałowe zależne od kinaz rodziny JAK (PI3K-AKT, RAS, FOXO3, mTOR) zostały uprzednio zidentyfikowane przez Doktorantkę w analizie nadreprezentacji, po wyciszeniu hsa-miR-363-3p w komórkach T-ALL. Podobne spostrzeżenie dotyczyło SOCS2 (ang. Suppressor of cytokine signaling 2), negatywnego regulatora ścieżki sygnałowej JAK-STAT. Klasteryzacja hierarchiczna poziomu ekspresji genów powiązanych ze ścieżką sygnałową JAK-STAT przeprowadzona w 47 próbkach pozyskanych od chorych z T-ALL pozwoliła na wyodrębnienie trzech (2 głównych) podgrup pacjentów o odmiennym profilu ekspresji genów (co ciekawe nie różniących się w zakresie poziomu ekspresji hsa-miR-363-3p). Negatywny wpływ na ekspresję SOCS2 może mieć także wykazana przez Doktorantkę podwyższona metylacja regionu promotorowego genu SOCS2, mogąca obok nieprawidłowej ekspresji hsa-miR-363-3p, negatywnie wpływać na aktywność ścieżki sygnałowej JAK-STAT. Niezależnym wynikiem tej analizy było potwierdzenie niekorzystnego trendu pomiędzy ekspresją SOCS1, SOCS2 i SOCS3 a przeżyciem wolnym od wznowy i przeżyciem całkowitym chorych na T-ALL.

Pytanie 4:

Jak wytłumaczyć brak różnic w ekspresji hsa-miR-363-3p w komórkach T-ALL po klasteryzacji hierarchicznej poziomu ekspresji genów powiązanych ze ścieżką sygnałową JAK-STAT?

Konkluzją przeprowadzonych badań jest 5 wniosków będących logicznym podsumowaniem przeprowadzonych analiz. Wszystkie z nich znajdują pełne uzasadnienie w wynikach przeprowadzonych badań. Wartym podkreślenia jest fakt dużego prawdopodobieństwa praktycznego zastosowania wyników przeprowadzonych badań w niedległej przyszłości w terapii T-ALL. Aktualnie bowiem zastosowanie terapeutyczne znalazły inhibitory ścieżki sygnałowej JAK-STAT (np. ruxolitinib) w terapii ostrej białaczki limfoblastycznej B-komórkowej, inhibitory BCL2 (venetoclax) w terapii przewlekłej białaczki limfocytowej B-komórkowej czy też leki demetylujące (np. azacitidine) w terapii ostrej białaczki szpikowej.

Podsumowanie

Przedstawiona do recenzji praca doktorska spełnia wszystkie obowiązujące strukturalne, metodologiczne i merytoryczne wymogi ustawowe o stopniach naukowych i o tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki.

Tym samym proszę wysoką Radę Naukową Instytutu Genetyki Człowieka PAN o dalsze procedowanie pracy doktorskiej Pani magister Moniki Drobnej-Śledzińskiej zgodnie z obowiązującym przepisami. Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie przedstawionej do recenzji pracy.

Z wyrazami szacunku i poważania



prof. dr hab. med. Krzysztof Lewandowski

Specjalista chorób wewnętrznych

Specjalista hematolog

Specjalista transplantologii klinicznej

Poznań, 22 marca 2023 roku

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