



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 Karoliny Rassek “Identification of mechanisms related to the expression of
TMEM244 gene and its role in cutaneous T-cell lymphomas”

Supervisor: prof. Grzegorz Krzysztof Przybylski, PhD, MD

Co-supervisor: Katarzyna Iżykowska, PhD

Mgr Karolina Rassek jest absolwentką studiów magisterskich na Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu (Wydział Farmacji, kierunek Analityka Medyczna, 2018).

W 2018 roku rozpoczęła prace w ramach studiów doktoranckich w Instytucie Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu realizując temat badawczy „Elucidating the function of the transmembrane protein TMEM244 and its role in the development of lymphoid malignancies”. Magister Karolina Rassek odbyła dwa staże zagraniczne: University of Edinburgh, Scotland (05.2022-07.2022), The ERASMUS+ scholar (Subject of the internship: Study of RNA-protein interactions of the TMEM244 gene) oraz University Medical Center Groningen, Netherlands (05.09.2022-09.09.2022), NEXT_LEVEL scholar (Subject of the study visit “Familiarization with the technique of AGO2 protein immunoprecipitation”).

W okresie studiów doktoranckich była współwykonawcą 1 grantu naukowego (“The role of class II histone deacetylases: HDAC9 and HDAC10 in Sézary syndrome”; Grant of the National Science Center “SONATA15”, head Katarzyna Iżykowska Ph.D.). Czynn timerzniczyła także w zjazdach naukowych (European Hematology Association, EHA) prezentując wyniki swoich prac badawczych. Była kilkakrotnie nagrodzona/wyróżniona za prowadzone badania naukowe ERASMUS+, NEXT_LEVEL, PROM, the Scientific Committee of the EHA).

Recenzja pracy na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu

Przedstawioną do recenzji praca doktorska jest podsumowaniem wyników eksperymentalnych opublikowanych w 3 pracach oryginalnych. Przedstawioną do oceny pracę uzupełnia 1 artykuł poglądowy (sumaryczny Impact Factor prac będących podstawą rozprawy to 24.582 punktów, wg bazy Web of Science Core Collection).

Prezentację wyników uzyskanych badań poprzedzono interesującym wstępem (strony 7-15) przedstawiającym:

1. charakterystykę skórnych postaci chłoniaków T-komórkowych (CTLC),
2. patogenezę TCLC
3. charakterystykę rodziny białek TMEM
4. omówienie dotychczasowych wyników badań nad identyfikacją nowych markerów przydatnych w rozpoznawaniu chłoniaków T-komórkowych

W kolejnych częściach przedstawionej do recenzji pracy na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu Doktorantka przedstawiła wyniki badań szczegółowych dotyczących funkcji biologicznej genu *TMEM244*,

zawierającego sekwencję nukleotydową długiego nie kodującego RNA. Omówienie wyników badań szczegółowych poprzedzono w każdym przypadku wstępem (prace 1-3), omówieniem uzyskanych wyników i wnioskami z przeprowadzonych badań (prace 1-3). Dopelnieniem rozprawy doktorskiej jest praca poglądowa poświęcona ocenie heterogenności komórek nowotworowych u chorych na skórne chłoniaki T-komórkowe w oparciu o analizę pojedynczych komórek techniką RNA-seq. Pomimo przeglądowego charakteru pracy także ta publikacja potwierdza dużą wiedzę Doktorantki w zakresie patogenezy skórnych chłoniaków T-komórkowych oraz ewolucyjnego i subklonalnego charakteru ich wzrostu.

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 1-112.

Recenzja szczegółowa

Praca 1: Iżykowska K, Rassek K, Żurawek M, Nowicka K, Paczkowska J, Ziolkowska-Suchanek I, Podralska M, Dzikiewicz-Krawczyk A, Joks M, Olek-Hrab K, Giefing M, Przybylski GK. Hypomethylation of the promoter region drives ectopic expression of TMEM244 in Sézary cells. J Cell Mol Med. 2020 Sep;24(18):10970-10977. doi: 10.1111/jcmm.15729.

Praca jest dobrze zaplanowanym i zrealizowanym projektem badawczym dotyczącym analizy związku pomiędzy stopniem metylacji genu *TMEM244* a jego ekspresją u chorych na mycosis fungoides (MF) oraz zespół Sezarego (SS). W pracy wykorzystano nowoczesne narzędzia badawcze, w tym qRT-PCR, ocenę stopnia metylacji dinukleotydów CpG w obrębie regionu promotorowego genu *TMEM244* techniką pyrosekwencjonowania, bezpośrednią demetylację wybranych obszarów genowych za pomocą systemu CRISPR-dCas9-TET1 w komórkach różnych chłoniaków i białaczek T- i B-komórkowych.

Głównym wynikiem przeprowadzonych badań jest stwierdzenie, że kluczowym mechanizmem regulującym ekspresję *TMEM244* jest stopień metylacji obszaru promotorowego genu, a zakłócenie tego procesu (hypometylacja) może leżeć u podłoża patogenezy nowotworów wywodzących się z linii limfocytów T.

Uwagi:

1. *W pracy wykazano występowanie różnic w ekspresji TMEM244 na komórkach MF pozyskanych z krwi obwodowej oraz szpiku. Jaki jest prawdopodobny powód odmiennej ekspresji TMEM244 na komórkach nowotworowych w różnych środowiskach biologicznych? Podobne zastrzeżenie dotyczy dużych różnic w ekspresji TMEM244 na komórkach SS u poszczególnych pacjentów poddanych ocenie*
2. *Czy stopień metylacji promotora genu TMEM244 jest jedynym czynnikiem regulującym ekspresję tego genu? Czy badano sekwencję promotora genu TMEM244 w indywidualnych przypadkach?*

Praca 2: Rassek K, Iżykowska K, Żurawek M, Pieniawska M, Nowicka K, Zhao X, Przybylski GK. TMEM244 Is a Long Non-Coding RNA Necessary for CTCL Cell Growth. Int J Mol Sci. 2023 Feb 9;24(4):3531. doi: 10.3390/ijms24043531

Praca jest kontynuacją uprzednio podjętych badań zmierzających do określenia znaczenia biologicznego ekspresji *TMEM244* u chorych na chłoniaki T-komórkowe. W badaniach podjęto próbę identyfikacji białka *TMEM244* stosując ocenę ekspresji specyficznego mRNA techniką qRT-PCR w różnych typach skórnych chłoniaków T-komórkowych (CTCL) oraz liniach komórkowych nie-CTCL, jednocześnie dokonując oceny ekspresji białka *TMEM244* metodą Western Blot. Wynikiem przeprowadzonych badań było wykazanie niekodującego charakteru mRNA *TMEM244*. Bardzo niskie prawdopodobieństwo kodującego charakteru badanej sekwencji nukleotydowej potwierdzono w eksperymentach *in silico* z zastosowaniem narzędzia CPAT. W kolejnym etapie badań stosując predykcję bioinformatyczną dla lnc mRNA oraz subkomórkowe frakcjonowanie materiału z następującą oceną qRT-PCR a także FISH potwierdzono głównie cytoplazmatyczną lokalizację transkryptu *TMEM244*. Innym godnym podkreślenia wynikiem przeprowadzonych badań było wykazanie, że ekspresja *TMEM244* jest niezbędna dla procesu wzrostu komórek CTCL (eksperymenty z wyciszaniem ekspresji poprzez zastosowanie shRNAs nakierowanych na transkrypt *TMEM244*) oraz że ekspresji w komórkach CTCL podlegają także dwie inne, dotychczas nie opisane, niekodujące i o nie znanej funkcji biologicznej formy splicingowe transkryptu *TMEM244* (metoda RACE).

Pytanie:

1. *Kodujący charakter genów rodziny TMEM potwierdzono jedynie w części przypadków. Czy inne geny tej rodziny, podobnie jak TMEM244 mają charakter genów nie-kodujących białko (lncRNA)?*

Praca 3: Rassek K, Iżykowska K, Żurawek M, Nowicka K, Joks M, Olek-Hrab K, Olszewska B, Sokołowska-Wojdyło M, Biernat W, Nowicki RJ, Przybylski GK. *TMEM244 Gene Expression as a Potential Blood Diagnostic Marker Distinguishing Sézary Syndrome from Mycosis Fungoides and Benign Erythroderma. J Invest Dermatol. 2023 Feb;143(2):344-347.e3. doi: 10.1016/j.jid.2022.08.046*

Praca jest kolejną analizą dotyczącą ekspresji *TMEM244* w nowotworowych komórkach T pozyskanych od chorych na SS, MF, erytrodermię oraz osób zdrowych. Celem przeprowadzonych badań było określenie przydatności diagnostycznej pomiaru ekspresji *TMEM244* w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC) oraz limfocytach T CD4+ pozyskanych odpowiednio za pomocą wirowania na gradiencie gęstości oraz negatywnej selekcji immunomagnetycznej w diagnostyce różnicowej SS. Pomiaru ekspresji *TMEM244* dokonano metodą RT-qPCR stosując jako geny referencyjne B2M oraz GAPDH. Badania te pozwoliły jednoznacznie stwierdzić że mediana ekspresji *TMEM244* w PBMC jest istotnie wyższa u chorych z SS w porównaniu do ekspresji *TMEM244* u chorych na MF i erytrodermię, a także osób zdrowych. Podobne różnice obserwowano w przypadku oceny ekspresji *TMEM244* w subpopulacji limfocytów CD4+. Podobne badania przeprowadzono także na innych subpopulacjach komórkowych krwi obwodowej (CD4+, CD8+, CD45RO+, CD45RA+, CD31+, CD56+, CD14+ i CD19+). Badania te potwierdziły, że wysoka ekspresja *TMEM244* dotyczy subpopulacji limfocytów T CD4+ i CD8+. Warte podkreślenia jest fakt podjęcia przez Doktorantkę dalszych badań w celu ustalenia w której z subpopulacji limfocytów pamięci T CD45RO+ (komórki T naïve czy też komórki T naïve CD31+) ma miejsce wzrost ekspresji *TMEM244*. W ich wyniku potwierdziła, że do wzrostu *TMEM244* dochodzi w komórkach pamięci T po ich aktywacji. W podsumowaniu, wyniki ocenianej pracy mają

duże znaczenie praktyczne w diagnostyce różnicowej SS. Potwierdzają także sens rutynowej oceny ekspresji TMEM244 u chorych na SS jako czynnika powiązanego z rokowaniem w tej grupie pacjentów.

Pytanie:

1. *Dane dotyczące ekspresji CD31 (PECAM-1) na subpopulacjach limfocytów T CD4+ i CD8+ są rozbieżne. Na jakiej podstawie wyciągnięto wniosek że ekspresja TMEM244 dotyczy limfocytów T po aktywacji? (doi: 10.1002/JLB.2HI0617-229RRR)*

Praca 4: Rassek K, Iżykowska K. Single-Cell Heterogeneity of Cutaneous T-Cell Lymphomas Revealed Using RNA-Seq Technologies. Cancers (Basel). 2020 Jul 31;12(8):2129. doi: 10.3390/cancers12082129

Praca jest podsumowaniem wiedzy na temat różnorodności zmian molekularnych u chorych na chłoniaki skórne T komórkowe. Umożliwia tym samym lepsze zrozumienie tematyki przeprowadzonych badań eksperymentalnych. Na szczególne wyróżnienie zasługuje próba analizy dotychczas opublikowanych wyników badań innych autorów w kontekście oceny zmian w pojedynczych komórkach CTCL (różnorodność zmian immunofenotypowych, zmian identyfikowanych w RNA-seq w subpopulacjach limfocytów T, czy też komórkach SS). Taka charakterystyka komórek CTCL umożliwi lepsze zrozumienie zjawisk towarzyszących rozwojowi zmian nowotworowych na różnych etapach onkogenezy, a także związku pomiędzy manifestacją kliniczną choroby a odpowiedzią na zastosowane leczenie.

Podsumowanie

W wyniku przeprowadzonych analiz Doktorantka sformułowała 6 wniosków. Wszystkie z nich znajdują pełne uzasadnienie w wynikach wykonanych badań. Rezultaty tych badań wnoszą istotny wkład w poznanie etiopatogenezy CTCL. Mogą być też przesłanką do opracowania nowych metod terapii celowanej w CTCL, których aktualne możliwości Doktorantka przedstawiła w pracy nie będącej częścią cyklu będącego przedmiotem oceny (Iżykowska K, Rassek K, Korsak D, Przybylski GK. Novel targeted therapies of T cell lymphomas. J Hematol Oncol. 2020 Dec 31;13(1):176. doi: 10.1186/s13045-020-01006-w).

Wartym podkreślenia jest fakt możliwego ich praktycznego zastosowania w diagnostyce różnicowej CTCL, szczególnie w przypadkach podejrzenia zespołu Sezarego.

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 Karoliny Rassek 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, 05 kwietnia 2023 roku

duże znaczenie praktyczne w diagnostyce różnicowej SS. Potwierdzają także sens rutynowej oceny ekspresji TMEM244 u chorych na SS jako czynnika powiązanego z rokowaniem w tej grupie pacjentów.

Pytanie:

1. *Dane dotyczące ekspresji CD31 (PECAM-1) na subpopulacjach limfocytów T CD4+ i CD8+ są rozbieżne. Na jakiej podstawie wyciągnięto wniosek że ekspresja TMEM244 dotyczy limfocytów T po aktywacji? (doi: 10.1002/JLB.2HI0617-229RRR)*

Praca 4: Rassek K, Iżykowska K. Single-Cell Heterogeneity of Cutaneous T-Cell Lymphomas Revealed Using RNA-Seq Technologies. Cancers (Basel). 2020 Jul 31;12(8):2129. doi: 10.3390/cancers12082129

Praca jest podsumowaniem wiedzy na temat różnorodności zmian molekularnych u chorych na chłoniaki skórne T komórkowe. Umożliwia tym samym lepsze zrozumienie tematyki przeprowadzonych badań eksperymentalnych. Na szczególne wyróżnienie zasługuje próba analizy dotychczas opublikowanych wyników badań innych autorów w kontekście oceny zmian w pojedynczych komórkach CTCL (różnorodność zmian immunofenotypowych, zmian identyfikowanych w RNA-seq w subpopulacjach limfocytów T, czy też komórkach SS). Taka charakterystyka komórek CTCL umożliwi lepsze zrozumienie zjawisk towarzyszących rozwojowi zmian nowotworowych na różnych etapach onkogenezy, a także związku pomiędzy manifestacją kliniczną choroby a odpowiedzią na zastosowane leczenie.

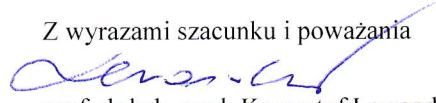
Podsumowanie

W wyniku przeprowadzonych analiz Doktorantka sformułowała 6 wniosków. Wszystkie z nich znajdują pełne uzasadnienie w wynikach wykonanych badań. Rezultaty tych badań wnoszą istotny wkład w poznanie etiopatogenezy CTCL. Mogą być też przesłanką do opracowania nowych metod terapii celowanej w CTCL, których aktualne możliwości Doktorantka przedstawiła w pracy nie będącej częścią cyklu będącego przedmiotem oceny (Iżykowska K, Rassek K, Korsak D, Przybylski GK. Novel targeted therapies of T cell lymphomas. J Hematol Oncol. 2020 Dec 31;13(1):176. doi: 10.1186/s13045-020-01006-w).

Wartym podkreślenia jest fakt możliwego ich praktycznego zastosowania w diagnostyce różnicowej CTCL, szczególnie w przypadkach podejrzenia zespołu Sezarego.

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 Karoliny Rassek 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, 05 kwietnia 2023 roku

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