

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 Katarzyny Anny Seligi

pt. „Poszukiwanie nowych prognostycznych i diagnostycznych markerów molekularnych w diagnostyce nieodróżnionych nowotworów tkanek miękkich”.

Rozprawa doktorska została zrealizowana w Narodowym Instytucie Onkologii im M. Skłodowskiej-Curie – Państwowym Instytucie Badawczym w Warszawie w Zakładzie Onkologii Molekularnej i Translacyjnej pod kierunkiem Pana promotora prof. dr hab. n. med. Janusza A. Siedleckiego i promotora pomocniczego dr n. med. Andrzeja Tysarowskiego.

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo Koordynatora ds. przewodów doktorskich Rady Naukowej Prof. dr hab. n. med. Zbigniewa Noweckiego (RNK-000/274/21).

Pierwsza nabyta translokacja swoista t(9;22)(q34;q11) została zidentyfikowana w komórkach przewlekłej białaczki szpikowej w roku 1960. Rozpoczęcie badań cytogenetycznych w guzach litych pozwoliło na dalszą identyfikację swoistych, wzajemnych translokacji chromosomowych (A) w mięsaku Ewinga t(11;22)(q24;q12) w 1983 roku oraz (B) w maziówczaku złośliwym t(X;18)(p11.2;q11.2) w 1986 r. Warto zaznaczyć, że na kartach historii badań genetycznych nad guzami litymi zapisał się polski lekarz i genetyk kliniczny - prof. dr hab. n. med. Janusz Limon a zidentyfikowana przez Niego wysoce swoista translokacja wzajemna t(X;18)(p11.2;q11.2) służyła przez ostatnie 30-35 lat jako narzędzie w diagnostyce różnicowej mięsaków maziówkowych z innymi wrzecionowatokomórkowymi postaciami nowotworów tkanek miękkich.

Historycznie wydawało się, że aberracje prowadzące do fuzji genowych są rzadkie i dotyczą głównie chorób rozrostowych układu krwiotwórczego, ewentualnie mięsaków człowieka. Przez dziesiątki lat podstawowym narzędziem diagnostycznym były metody cytogenetyki

klasycznej (kariotypowanie) i genetyki molekularnej (fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*). Biorąc pod uwagę, że obecna klasyfikacja Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) dla mięsaków tkanek miękkich (STS) obejmuje około 80 jednostek zdefiniowanych dzięki połączeniu charakterystycznych cech morfologicznych, immunohistochemicznych i genetycznych, szybka diagnostyka różnicująca staje się coraz większym wyzwaniem. Tym samym temat pracy wpisuje się w nurt aktualnych badań.

Przez dziesiątki lat molekularne badania cytogenetyczne z wykorzystaniem techniki FISH pozwalające zidentyfikować translokacje swoiste lub rearanżacje wybranych genów – przeżywały swój rozkwit. Ale to rozwój nowych wysokoprzepustowych technologii pozwolił na szybsze szcharakteryzowanie znanych lub zidentyfikowanie nowych fuzji genowych w guzach litych. Ostatni rok pandemii uwypuklił problem dostępu pacjentów do referencyjnych ośrodków onkologicznych czy trudności w zgłoszeniu do placówek opieki zdrowotnej dla uczestników badań klinicznych dotyczących mięsaków. Jednocześnie nie ustały prace nad wykrywaniem nowych markerów prognostycznych i predykcyjnych z użyciem innowacyjnych technologii. Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani Katarzyny A. Seligi nawiązuje do powyższych aktualnych problemów medycznych, w tym diagnostyki rzadkich nowotworów poza referencyjnymi Centrami Onkologii a przede wszystkim podejmuje poszukiwanie tychże markerów w nowotworach tkanek miękkich przy użyciu sekwencjonowania nowej generacji.

Przedstawiona rozprawa doktorska ma typowy układ powszechnie stosowany w pracach eksperymentalnych. Zawiera 172 strony wydruku komputerowego, z podziałem na 8 rozdziałów. Dodatkowo umieszczono spisy tabel, rycin, zdjęć, równań i stosowanych skrótów oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. Piśmiennictwo zawiera 149 pozycji. Układ pracy jest logiczny, niebudzący zastrzeżeń.

WSTĘP: We wstępie możemy wyróżnić 8 podrozdziałów. Autorka objaśnia epidemiologię, etiologię, klasyfikację, diagnostykę i aktualne wytyczne leczenia mięsaków tkanek miękkich. Niewątpliwie na szczególną uwagę zasługuje 8 stron wstępu dotyczącego radioterapii, chemioterapii i leczenia ukierunkowanego molekularnie. Ostatnie dwa podrozdziały zostały poświęcone głównemu zagadnieniu pracy, tj. technikom biologii molekularnej oraz wybranym typom mięsaków.

Uwaga: Jak sama doktorantka zauważa – przełomem w różnicowaniu mięsaków stanowiła diagnostyka molekularna. Wytyczne praktyki klinicznej ESMO-EURACAN-GENTURIS 2021 dotyczące diagnostyki, leczenia i obserwacji opublikowane w lipcu br. wskazują konieczność wsparcia diagnostyki patomorfologicznej o diagnostykę w zakresie molekularnym jak i cytogenetycznym. Zabrakło mi jednak użycia pojęć takich jak aberracja swoista czy swoista wzajemna translokacja chromosomowa oraz historycznego odniesienia się do swoistej translokacji wzajemnej t(X;18) odkrytej przez polskiego genetyka klinicznego. Powyższa treść znacząco mogłaby ubogacić wstęp rozprawy.

Również wartością dodaną byłoby poszerzenie rozdziału o sekwencjonowaniu następnej generacji o panele genetyczne inne niż tylko te ujęte w metodologii, na których pracowała Doktorantka. Na rynku dostępne są zarówno panele diagnostyczne dedykowane mięsakom do analizy zmian somatycznych i germinalnych. Tym niemniej temat mięsaków tkanek miękkich

i stosowanych obecnie technologii w diagnostycznych laboratoriach medycznych jest opisany w sposób wyczerpujący a powyższe uwagi nie umniejszają jego treści.

CEL PRACY: Cel pracy został prawidłowo określony w ramach założonego nurtu badań.

MATERIAŁY I METODOLOGIA: Badania zrealizowano przy współpracy 3 warszawskich ośrodków: (1) Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego, (2) Instytutu Matki i Dziecka oraz (3) Instytutu „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”. Współpraca pomiędzy różnymi jednostkami, specjalistami z różnych dziedzin jak patomorfologia, laboratoryjna genetyka medyczna i onkologia zaowocowała przedstawioną mi do recenzji pracą badawczą na materiale archiwalnym uzyskanym od 350 chorych z rozpoznaniem nowotworem tkanek miękkich. Jest to niezmiernie imponującą grupą pacjentów z rzadkimi, heterogennymi i agresywnymi nowotworami. Wielokrotnie podkreślana, również z innych rozdziałach rozprawy, 5-letnia interdyscyplinarna współpraca diagnosty laboratoryjnego z lekarzami celem wypracowania nowego algorytmu postępowania, zwłaszcza gdy istnieje konieczność weryfikacji rozpoznania histopatologicznego, została spełniona w najwyższym stopniu. Ze swojej strony chciałabym pogratulować Doktorantce nie tylko opanowania techniki sekwencjonowania nowej generacji ale również kompetencji w zakresie umiejętności miękkich takich jak dbałość o komunikację i współpracę pomiędzy pracownikami różnych instytutów, zawodów medycznych i specjalizacji.

Doktorantka w rozdziale materiały i metody zwięźle opisała techniki, którymi się posługiwała, uzupełniając odpowiednio licznymi tabelami, równaniami matematycznymi i zdjęciami. Trafnie zaznacza (w metodach, protokół wykonania bibliotek - str. 72 etap 4), że z uwagi na różną jakość izolowanego materiału kluczowa jest kontrola wyizolowanego RNA jak również ocena jakościowa i ilościowa samych bibliotek. W przedstawionej rozprawie Doktorantka wybrała metodę qPCR z użyciem barwnika SYBER Green. W odniesieniu do powyższego zabrakło mi informacji o ustalonej minimalnej ilości RNA jaka była dopuszczona do przygotowania bibliotek? Czy Doktorantka miała możliwość ocenić RIN korzystając z analizy fluorymetrycznej w mikroukładzie z wykorzystaniem bioanalizatora? Doktorantka nie podaje także czy wszystkie próbki przeszły jakościową i ilościową ocenę.

Uwagi: Należy doprecyzować metodologię o liczbę zliczonych komórek, punkt odcięcia dla badań FISH oraz doprecyzować opis zdjęć 1, 2 i 3 (str. 50 i 89) przedstawiający możliwe rozkłady sygnałów fluorescencyjnych. Brakuje informacji o producencie sondy oraz dokładnej legendy budowy sondy, tzn. sposobu znakowania końców genu dla sondy break apart np. 5'EWSR1 Orange, 3' EWSR1 Green i sposobu znakowania genów dla sondy fuzyjnej np. gen *COL1A1* - Orange, gen *PDGFB* – Green.

W szczególności proszę o doprecyzowanie opisu dla zdjęcia 3 lub przedstawienie innego zdjęcia w trakcie obrony publicznej. Zastanawiający jest brak prawidłowych sygnałów z niezmiennych *loci* genowych. Zakładając, że Doktorantka użyła sondy tego samego producenta (metody 3.2.6. Cytotest) - nieprawidłowa komórka nowotworowa ze standardową translokacją t(17;22) posiadałaby następujący rozkład sygnałów:

- fuzja *COL1A1-PDGFB*
- fuzja *PDGFB-COL1A1*
- prawidłowy sygnał zielony z genu *PDGFB*
- prawidłowy sygnał pomarańczowy z genu *COL1A1*.

Przykłady możliwych rozkładów sygnałów fluorescencyjnych dla sond break apart lub sond fuzyjnych w publikacjach (1) *Molecules* 2020, 25, 1864; doi:10.3390/molecules25081864.; (2) *Int J Clin Exp Pathol.* 2018; 11(8): 4052–4059, (3) *Journal of Dermatology* 2017;44:798–802

WYNIKI: Wyniki zostały zaprezentowane na 38 stronach, podzielonych odpowiednio na liczne podrozdziały, zawierają łącznie 21 tabel, 7 wykresów i 5 rycin łącznie z przejrzystym schematem postępowania w diagnostyce nowotworów tkanek miękkich. Staranne przedstawienie wyników i bogactwo form graficznych pozwalają na łatwą analizę wyników. Na szczególną uwagę zasługują nowo zidentyfikowane rearanżacje (n=6) wyodrębnione w tabeli 26 i tabeli 30, które pozwoliły dla 3 przypadków wyodrębnić nowe podjednostki wśród mięsaków nieodróżnionych. Gratuluję i zachęcam do opublikowania tych danych w czasopiśmie z bazy JCR.

Uwagi: Zabrakło mi w rozprawie zweryfikowania rozbieżnych wyników inną niezależną metodą molekularną (RT-PCR, ddPCR, sekwencjonowanie metodą Sanger). Zgodnie z opisem - materiał badawczy zawierał od 20 do 95% utkania nowotworowego, tym samym analizy molekularne były możliwe do przeprowadzenia. W 33% przypadków dokonano zmiany rozpoznania, stwierdzono 14 wyników fałszywie ujemnych oraz 21 fałszywie dodatnich dla metody FISH. Oczywiście na uwagę zasługuje fakt, że Doktorantka uczestniczyła w dwóch międzynarodowych kontrolach jakości badań genetycznych: (1) *Sarcoma* 2020 otrzymując maksymalną liczbę punktów, (b) oraz w pilotażowej analizie fuzji dla genu *NTRK*. Tym niemniej weryfikacja czy którykolwiek z wyników NGS rozbieżnych z wynikiem FISH nie jest wynikiem fałszywie pozytywnym bądź fałszywie negatywnym w sposób jednoznaczny zweryfikowałaby uzyskany rezultat i wzbogaciła zaproponowany algorytm postępowania. Niestety w przedstawionej do recenzji rozprawie nie udokumentowano w jaki sposób przeanalizowano rozbieżne wyniki.

W rozprawie nie wykazano istotnych różnic w stężeniu RNA uzyskanego z blozków parafinowych pomiędzy materiałem pochodzącym z różnych lat (lata 2016-2021), co mogłoby wskazywać na prawidłowy sposób utrwalenia materiału i zachowanie jego właściwości pomimo archiwizacji. Zabrakło jednak informacji o jakości RNA i analizie porównawczej badającej zależność pomiędzy wyjściową jakością RNA a jednorodnością pokrycia amplikonów uzyskanych podczas sekwencjonowania. Interesująca byłaby taka ocena przeprowadzona dla przypadków z rozbieżnymi wynikami NGS i FISH. Można by także podjąć się oceny wpływu niskiej wartości RIN/słabej jakości RNA na wynik końcowy. Wartością dodaną byłoby również porównanie wyników analiz bioinformatycznych z wykorzystaniem różnych algorytmów doszczegółowienia lub osobnego podrozdziału dotyczącego samych analiz bioinformatycznych (analiza I, II, III i IV rzędowa)

DYSKUSJA: Doktorantka prawidłowo konfrontuje wyniki własne z literaturą, wzbogacając o doświadczenie wypracowane w macierzystym ośrodku referencyjnym. Doktorantka ocenia przydatność metody sekwencjonowania nowej generacji w różnicowaniu nowotworów tkanek miękkich. W oparciu o zidentyfikowane zmiany genetyczne dokonana zostaje reklasyfikacja diagnoz zgodnie z wytycznymi WHO z 2020 roku. Bardzo rzeczowo i dojrzałe wytłumaczone są trudności w diagnostyce różnicowej między Ewing Sarcoma a Synovial Sarcoma, ze zmianą rozpoznania łącznie. Doktorantka szeroko dyskutuje dlaczego badanie FISH nie zawsze wystarcza do postawienia ostatecznej diagnozy i jaka jest przewaga innowacyjnej metody NGS. Pani Katarzyna Seliga dojrzałe dysputuje nad nowymi podgrupami

w klasyfikacji nowotworów tkanek miękkich wskazując na znaczącą rolę wyników NGS nie tylko w różnicowaniu ale również w analizie predykcyjnej. Ostatni, ważny aspekt zawarty w dyskusji to przedstawienie ograniczeń w pracy badawczej dla 53 mięsaków nieodróżnionych wraz z zaznaczeniem dalszych potencjalnych kierunków badań.

UWAGI: Doktorantka nie omawia przyczyn rozbieżności 35 z 91 wyników dla badań wykonanych zarówno metodą FISH i NGS – brakuje krytycznego spojrzenia na obie metody a nie tylko FISH. Bardzo zastanawiający jest wysoki odsetek fałszywie dodatnich wyników dla metody FISH a jednocześnie niepokojący jest przykładowy rozkład sygnałów fluorescencyjnych dla sondy fuzyjnej zaprezentowany w dysertacji.

Mało jest opublikowanych prac porównujących wyniki uzyskane z wykorzystaniem metod cytogenetyki molekularnej (FISH) i genetyki molekularnej (NGS) w mięsakach tkanek miękkich. Można znaleźć w literaturze analizy porównawcze z użyciem metod RT-PCR i FISH dla opisywanej w dysertacji sondy fuzyjnej COL1A1-PDGFB. Wyniki tych badań przeprowadzonych dla 103 próbek od pacjentów zdiagnozowanych z dermatofibrosarcoma protuberans (DFSP) wskazały, że obie techniki wykazują podobną swoistość (100%), ale to właśnie FISH jest przedstawiana jako metoda czulsza niż RT-PCR (90% vs. 72%) (Genes, Chromosomes & Cancer 50:510-517; 2011). W rozprawie doktorskiej w celu utworzenia bibliotek - użyto zestawu komercyjnego wykorzystującego technikę multiplex PCR. Wyizolowany RNA z FFPE często jest zdegradowany i przyczynia się do wyników fałszywie negatywnych. Równie ciekawa jest weryfikacja wyników RNA-Seq dla 76 tkanek (w tym 21 materiałów archiwalnych pochodzących od pacjentów z rozpoznaniem mięsakiem tkanek miękkich) (Journal of Molecular Diagnostics 9 vol.20, no4, 2018). Metodą RNA-seq zidentyfikowano 38 z 41 fuzyj genów wykrytych inną metodą, taką jak hybrydyzacja fluorescencyjna *in situ* lub RT-PCR, z czułością 93%. W weryfikacji RNA-Seq – potwierdzono trzy wyniki fałszywie ujemne, z korzyścią dla metody FISH. Oczywiście zastosowanie innowacyjnej metody RNA-seq pozwoliło zidentyfikować dodatkowe 22 fuzyje w 17 próbkach guza, które nie zostały wykryte innymi metodami. Niemniej jednak na uwagę zasługuje fakt, że wszystkie fuzyje zidentyfikowane przez RNA-Seq (Illumina) zostały ocenione przez RT-PCR i sekwencjonowanie Sangera w celu ich potwierdzenia – czego zabrakło mi w niniejszej dysertacji.

Również brakuje w dyskusji polemiki nad analizą bioinformatyczną. Jednym z przykładów bioinformatycznych artefaktów jest fuzyja ACTG1-ACTB (wynika to z faktu, że gen *ACTB* (położony na chromosomie 7) i gen *ACTG1* (położony na chromosomie 17) są genami wysoce homologicznymi). Wśród wykrytych wariantów fuzyjnych (str. 98), jedna z wykrytych translokacji dotyczy genu *ACTB*. Czy możliwa była zatem identyfikacja translokacji ACTB-GLI1? Czy wśród parametrów kontrolnych sekwencjonowania oceniana jest poprawność procesu przyrównania odczytów do sekwencji referencyjnej?

Doktorantka jest świadoma ograniczenia metody badań FISH i z dużą erudycją opisuje możliwości uzyskania wyników fałszywie dodatnich jak i ujemnych, ale tylko dla tej jednej metody. Zabrakło mi jednak polemiki nad wynikami NGS oraz omówienia na jakiej podstawie Doktorantka ustaliła, że analizy FISH dają wynik fałszywie dodatni a nie NGS wynik fałszywie ujemny? Proszę Doktorantkę o odpowiedź na powyższe w trakcie publicznej obrony, również o wyjaśnienie jakiej jakości był RNA użyty jako matryca i jakie stężenie było otrzymane dla

bibliotek, gdzie uzyskano rozbieżne wyniki. Czy podjęto się różnych analiz bioinformatycznych do analizy wariantów (tzn. z wykorzystaniem różnych platform, oprogramowań)? Czy rozbieżne wyniki były weryfikowane metodą RT-PCR, ddPCR czy sekwencjonowaniem Sangera? Metoda NGS jest nie do przecenienia, niemniej jednak należy pamiętać, że jak każda metoda – jest obciążona błędami na różnych etapach zarówno przedlaboratoryjnych jak i analitycznych. Zgodnie z celem pracy, Doktorantka oceniała przydatność metody sekwencjonowania następnej generacji do identyfikacji markerów różnicujących i predykcyjnych. Proszę Panią Katarzynę Seligę o przedyskutowanie błędów przedlaboratoryjnych, analitycznych (w tym bioinformatycznych) i postanalizacyjnych jakie mają wpływ na powodzenie analizy NGS i prawidłową identyfikację markerów różnicujących i predykcyjnych.

Tekst rozprawy został napisany poprawnie merytorycznie, logicznie i w sposób bardzo szczegółowy, opisuje nowoczesne metody z wykorzystaniem sekwencjonowania nowej generacji. Z drugiej strony, zauważono drobne błędy związane z estetyką pracy, formatowaniem czy bibliografią, na które w przyszłości należałoby zwrócić większą uwagę.

1. Piśmiennictwo: zabrakło źródłowych publikacji, zwłaszcza dotyczących klasycznych, najbardziej znanych aberracji swoistych. Tym samym cytowanie prac innych bez sprawdzenia pierwotnego źródła - wprowadza w błąd, np. str. 59 „w 1992 wykryto fuzję z udziałem genu EWSR1-FL11” - nie zgadza się rok – powinien zostać podany rok 1983, inny przykład – w miejsce cytowanej publikacji z badaniami eksperymentalnymi Ginsberg’a z 1999 powinno być podane opracowanie naukowe osób, które zidentyfikowały zmianę: Chromosomal translocation (11; 22) in cell lines of Ewing's sarcoma. C R Seances Acad Sci III. 1983;296(23):1101-3
2. Braki bibliografii, str. 52-55, str. 21, paragraf NF2.
3. Drobne błędy związane z formatowaniem tabel np. tabela 1, 5, lub brak opisu tabeli (str.105).
4. Stosowanie skrótów myślowych lub użycie „języka slangowego” w pisanej wypowiedzi rozprawy:
np. zwyczajowa nazwa zawodu
np. str. 88 - 30% komórek z aranżacją – zamiast z sygnałem fuzyjnym lub z translokacją.
np. str. 89: Zbyt ogólny opis ryciny; brak informacji o producencie sond, brak szczegółowej legendy
5. Nieścisłość nazewnictwa medycznego. Należy zachować w rozprawie, przyszłych publikacjach czy prezentacjach jednolite i konsekwentne nazewnictwo zgodne z dziennikiem ustaw Rzeczypospolitej Polskiej dla medycznych laboratoriów diagnostycznych w zakresie badań genetycznych (molekularnych czy cytogenetycznych), zawodów medycznych (lekarz, diagnosta laboratoryjny) jak i specjalizacji (specjalista: patomorfolog, specjalista laboratoryjnej genetyki medycznej). Biolog molekularny jest nazwą zwyczajową bez prawa wykonywania zawodu medycznego, tym samym byłabym daleka od sugestii w rozprawie, że biolog molekularny może brać czynny udział w diagnostyce różnicowej i zmianie rozpoznania;

natomiast diagnosta laboratoryjny/ specjalista laboratoryjnej genetyki medycznej – już zdecydowanie tak.

6. Pojedyncze błędy redaktorskie np. str. 155: jest „sift” powinno być „soft”
7. Nazewnictwo zmian genetycznych nie zawsze zgodne z obowiązującą nomenklaturą podawaną w wytycznych HGVS (Human Genome Variation Society).

Wyszczególnione powyżej nieścisłości nie mają wpływu na moją pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej. Temat podjęty przez mgr Katarzynę Selige w przedłożonej mi rozprawie jest ciekawy i należy zaznaczyć dużą wartość pracy wykonaną nową innowacyjną technologią sekwencjonowaniem nowej generacji na bardzo dużej grupie pacjentów z rzadkimi, heterogennymi i agresywnymi nowotworami. Mając na uwadze unikalność grupy badawczej chciałabym podkreślić swoje zadowolenie, że Doktorantka jest świadoma dużego potencjału w prowadzeniu dalszych badań z sekwencjonowaniem całego eksomu bądź analiz obciążeń mutacyjnych w guzach czy w zakresie proteomiki.

Wniosek końcowy:

Przedstawiona do oceny rozprawa Pani mgr Katarzyny Seligi pt. „Poszukiwanie nowych prognostycznych i diagnostycznych markerów molekularnych w diagnostyce nieodróżnionych nowotworów tkanek miękkich” spełnia wszystkie kryteria i wymagania określone w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym. W związku z powyższym zwracam się do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im M. Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Seligi do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Bydgoszcz, 31 Lipiec 2021 r.