



Prof. emeritus Iwona Włodarska, PhD
CENTRUM GENETYKI CZŁOWIEKA
Katolicki Uniwersytet Leuven
Leuven
Belgia

OUR REFERENCE

Recenzja

YOUR REFERENCE

LEUVEN

03.02.2022

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Michaliny Zajdel

pt. „Analiza profili ekspresji mikroRNA i mRNA w chłoniaku podobnym do chłoniaka Burkitta z aberracją 11q (BLL, 11q)”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została przygotowana w Zakładzie Biologii Nowotworów Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie - Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie, pod kierunkiem dr hab. n. med. Jana Konrada Siwickiego, profesora instytutu.

Chłoniaki stanowią grupę nowotworów układu limfatycznego wykazujących zróżnicowane cechy immuno-histopatologiczne, kliniczne i biologiczne. Stanowią one klonalne rozrosty neoplastycznie komórek B, T lub NK, a ich fenotyp często odzwierciedla stadium rozwojowe limfocytu, który uległ transformacji. Klasyfikacja chłoniaków, niezbędna dla diagnostów i klinicystów, była wielokrotnie modyfikowana w ostatnich dekadach, podążając za postępem wiedzy o ich biologii, patologii i obrazie klinicznym. W aktualnie obowiązującej klasyfikacji nowotworów układu limfatycznego opublikowanej przez WHO w 2017 obok szeregu jednorodnych, dobrze scharakteryzowanych jednostek chłoniaków, rozpoznano również kilka nowych „tymczasowych” podtypów tych nowotworów. Te ostatnie stanowią wyzwanie badawcze, gdyż zazwyczaj reprezentują bardzo rzadko występujące nowotwory, jak np. ‘Chłoniak podobny do chłoniaka Burkitta z aberracją 11q’ w skrócie BLL,11q. Ten agresywny typ chłoniaka o fenotypie dojrzałych komórek B wykazuje szereg cech wspólnych z powszechnie znanym chłoniakiem Burkitta (*Burkitt lymphoma*, BL), ale wyróżnia się brakiem klasycznej translokacji/ekspresji genu *MYC*, typowej dla BL. Jego kariotyp, jednakże, cechuje zagadkowa aberracja 11q+/- powstała w wyniku powielenia (duplikacja/amplifikacja) proksymalnej części długiego ramienia tego chromosomu (11q) i jednoczesnej utraty jego dystalnej części. Konsekwencje molekularne tej aberracji, jak i wiele innych aspektów molekularnej patogenezы BLL,11q wymagają dalszych badań, które pozwoliłyby odpowiedzieć na klinicznie ważne pytanie, czy BLL,11q stanowi odrębną jednostkę chorobową, czy też wariant BL. W ostatnich latach podjęto pierwsze próby zdefiniowania profilu ekspresji genów i profilu mutacyjnego BLL,11q, ale wzór ekspresji mikroRNA w tym nowotworze pozostaje jak dotąd nieznany.



Tego zadania podjęła się Pani mgr inż. Michalina Zajdel, a wyniki swoich badań przedstawiła w przedłożonej do zaopiniowania rozprawie doktorskiej. Celem badawczym była charakterystyka molekularna BLL,11q w porównaniu do chłoniaka Burkitta, a dodatkowo także do GCB DLBCL,NOS, w oparciu o badanie wzoru ekspresji mRNA i mikroRNA przy użyciu technik sekwencjonowania następnej generacji. Podjęta przez Doktorantkę tematyka badawcza leży w głównym nurcie badań naukowych prowadzonych przez zespół prof. Siwickiego, a zważywszy, że NIO jest wiodącym w Polsce ośrodkiem diagnostyki, leczenia i badań nad chłoniakami, Pani Michalina Zajdel miała sprzyjające warunki do osiągnięcia wytyczonego celu naukowego. Współpraca z klinicystami, a zwłaszcza z zespołem dr Rymkiewicza, który opracował szybką ścieżkę diagnostyczną BLL,11q na podstawie biopsji cienkoigłowej, gwarantowała zebranie reprezentatywnej serii dobrze scharakteryzowanych przypadków BLL,11q. Współpraca z zespołem prof. Barbary Pieńkowskiej-Grela i dr Beaty Grygalewicz, który wniósł tematykę BLL,11q na forum międzynarodowe, gwarantowała prawidłową ocenę (cyto)genetyczną wyselekcjonowanych przypadków. Tak więc, zarówno dostęp do materiału diagnostycznego przypadków BLL,11q, jak i do najnowszej technologii sekwencjonowania następnej generacji (*next generation sequencing*, NGS), oraz uprzednio wypracowana przez Doktorantkę ekspertyza z zakresu profilowania miRNA w nowotworach (trzy publikacje) stanowiły solidną podstawę tego projektu. Doktorantka czynnie uczestniczyła w przygotowaniu i zabezpieczeniu próbek z materiału klinicznego i dokonała ich dalszej obróbki, łącznie z przygotowaniem bibliotek dla mRNA i mikroRNA.

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Michaliny Zajdel została sporządzona w postaci jednego obszernego dzieła liczącego 249 stron, starannie przygotowanego pod względem edytorskim i napisanym poprawnym językiem naukowym. Monografia jest przejrzysta i zawiera treści typowe dla dysertacji: wykaz skrótów stosowanych w pracy, streszczenie w języku polskim i angielskim, cel pracy, rozdział opisujący materiał kliniczny, aparaturę i zastosowane metody badawcze (34 sekcje), rozdział przedstawiający wyniki badań wstępnych (4 sekcje) i badań włączonych do dysertacji (27 sekcji), dyskusję, wnioski, piśmiennictwo (264 pozycje) oraz materiały dodatkowe (5 aneksów).

Na 21 stronach wstępu Doktorantka streszcza obecny stan wiedzy w przedmiotowym temacie. Podaje charakterystykę poszczególnych podtypów chłoniaków włączonych w badania oraz omawia biogenezę mikroRNA, mechanizmy ich funkcjonowania oraz rolę w nowotworzeniu. Doktorantka przedstawia również wyniki badań wstępnych wzoru ekspresji trzech wybranych mikroRNA w BL i BLL,11q, opublikowanych w 2015. Aktualne badania, będące rozszerzeniem badań wstępnych, zostały wykonane na serii 6 przypadków BLL,11q, 8 przypadków BL, 6 przypadków MYC- GCB DLBCL i 8 przypadków MYC+ GCB DLBCL. Biblioteki mRNA i mikroRNA poszczególnych próbek zostały poddane sekwencjonowaniu RNA, a otrzymane dane Doktorantka poddała szczegółowej analizie bioinformatycznej i częściowo zweryfikowała przy użyciu RT-qPCR i/lub cyfrowego PCR. W sumie, Doktorantka dokonała >40 porównawczych analiz profili ekspresji mRNA i mikroRNA w BLL,11q vs BL



oraz vs MYC+/- GCB DLBCL,NOS. Badania te pozwoliły na identyfikację 50 transkryptów mRNA istotnie różnicujących BLL,11q i BL, wzoru transkrypcji grupy genów, których ekspresja jest prawdopodobnie regulowana przez MYC i tzw. molekularnej sygnatury BL w obu podtypach chłoniaków. Podobną strategię zastosowano również do analizy ekspresji mikroRNA w BLL,11q, BL i MYC+/- GCB DLBCL,NOS. Doktorantka, między innymi, zidentyfikowała 39 cząstek mikroRNA istotnie różnicujących BLL,11q i BL, i ustaliła >60% podobieństwo ekspresji grupy mikroRNA regulowanych przez MYC do BL. Analizy porównawcze poziomu ekspresji mRNA i mikroRNA zostały uzupełnione przez szereg analiz ontologicznych mających za zadanie m.in. identyfikację ścieżek sygnałowych i/lub procesów biologicznych, w których zaangażowane są geny i mikroRNA, których poziom ekspresji znamienne różnicuje BLL,11q i BL. Opracowanie przedstawionych wyników nie budzi zastrzeżeń; są one przekonujące i prawidłowo zinterpretowane oraz zilustrowane licznymi autorskimi rycinami. Ryciny (w sumie 44), w dużej mierze dendrogramy i mapy cieplne, zostały starannie przygotowane, czytelnie opisane i są utrzymane w podobnej konwencji, co zapewnia ich czytelność i ułatwia porównanie. W Dyskusji (19 stron) Doktorantka skrupulatnie omawia uzyskane wyniki i konfrontuje je z opublikowanymi danymi i aktualnym stanem wiedzy. Pracę kończy podsumowanie i wnioski dowodzące odrębności biologicznej profilu molekularnego BLL,11q, co przemawia za jego wyodrębnieniem jako podtypu agresywnego B-NHL.

Uważam, że rozprawa doktorska Pani Michaliny Zajdel jest cenna i dużo wnosi do istniejącej, na razie fragmentarycznej, wiedzy na temat molekularnej patogenezы BLL,11q. Tematyka jest bardzo aktualna, a badania wychodzą naprzeciw oczekiwaniom diagnostycznym i klinicznym. Analizy danych zostały starannie zaplanowane, rzetelnie wykonane i klarownie przedstawione. Ich ilość i różnorodność świadczy o praktycznej wiedzy Doktorantki w dziedzinie bioinformatyki i swobodnym poruszaniu się w tym temacie.

Doktorantka nie uniknęła jednakże różnego rodzaju drobnych błędów. Ich wyłonienie jest obowiązkiem recenzenta, więc przedstawiam je, wraz z kilkoma uwagami krytycznymi, w porządku chronologicznym:

- Wstęp zawiera wyłącznie treści tekstowe, nie zilustrowane żadną ryciną. Bardzo przydatne dla czytelników, zwłaszcza tych nie znających dokładnie zagadnienia, byłyby przynajmniej dwie grafiki: pierwsza, pokazująca schemat chromosomu 11 z zaznaczonymi regionami maksymalnej i minimalnej duplikacji/amplifikacji i utraty (na podstawie zbiorczych danych literaturowych), wraz z mapą genów i mikroRNA zlokalizowanych w tych obszarach, a diskutowanych w późniejszych rozdziałach dysertacji; druga, przedstawiająca biogenezę mikroRNA, ilustrującą sekcję 1.7.

- Uważam, że Autorka zbyt często powołuje się na publikacje przeglądowe i rozdziały w książkach (trudno osiągalne dla recenzentów), zamiast cytować prace oryginalne, co jest dobrą praktyką naukową.



W ten sposób znaczący udział naukowców, którzy jako pierwsi zidentyfikowali i scharakteryzowali molekularnie t(8q24/MYC) w BL, czy odkryli microRNA, został pominięty w tej pracy.

- Str. 28: Powołując się na klasyfikację WHO, Doktorantka pisze o dwóch grupach chłoniaków: chłoniaki nie-Hodgkina (NHL) i chłoniaki Hodgkina (HL). Ten podział jest powszechnie używany, ale oficjalnie nie uwzględniony w żadnej z dwóch cytowanych przez Autorkę klasyfikacji WHO.
- Str. 30, cytuje: „Ocena kariotypu (agresywnych chłoniaków) wymaga krótkiej hodowli komórek pobranych od pacjenta *metoda biopsji cienkoigłowej*”. Istotny w tym stwierdzeniu jest wymóg użycia świeżego materiału klinicznego do badań cytogenetycznych. Natomiast metoda jego pobrania, czy to przy pomocy biopsji cienkoigłowej czy chirurgicznej, w ogólnym kontekście tego zdania nie jest ważna.
- Sekcja 3.1. Opis materiału klinicznego mógłby być bardziej przejrzysty i uproszczony gdyby Doktorantka przedstawiła istotne dane kliniczne, immunofenotypowe i (cyto)genetyczne wyselekcjonowanych przypadków w tabeli zbiorczej. Dane te uzupełnione odpowiadającym numerem próbki, do której Doktorantka odnosi się w późniejszych rozdziałach, jak również wskazaniem techniki identyfikacji 11q+/- (FISH? aCGH?), bardzo ułatwiłyby ocenę tej dysertacji. Czy któryś z przypadków BLL,11q był włączony w poprzedni projekt (Zajdel i wsp. 2015)?
- Str. 53, cytuje: „Grupa przypadków z rozpoznaniem DLBCL,NOS zawierała 55 próbek pobranych od 33 kobiet i 30 od mężczyzn”. Czy kalkulacja próbek jest prawidłowa?
- Str.55/56, uwaga formalna: kariotypy powinny być opisane zgodnie z wymogami nomenklatury ISCN (*An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*), czyli być kompilacją wyników cytogenetycznych i badań FISH/aCGH. Aktualny opis kariotypów, zapewne roboczy, nie uwzględnia del(11q), która jest niezbędnym elementem aberracji 11q+/- . Należy to uwzględnić przygotowując pracę do publikacji.
- Sekcja 4.1. Opis badań wstępnych (str. 82) jest bardzo ogólny i nie zawiera nawet liczby badanych przypadków. Uważam, że oryginalna publikacja z 2015 powinna być włączona do dysertacji.
- Str.99 i 128. Z badań wynika, że *NCAM1* i miR-34c/b są jedynymi genami z rejonów powielenia/utrąty na chromosomie 11q, które wykazały zmienioną ekspresję w BLL,11q vs BL. Co znaczy, że żaden z genów/miR zlokalizowanych w rejonie utraty 11q nie wykazał znaczącego obniżenia ekspresji w badanych przypadkach. Kontrastuje to z danymi Salaverria et al. (2014) wskazującymi na znacząco niską ekspresję 4 genów z 11qter (FLI1, SNX19, NCAPD3 i ACAD8) w BLL,11q. Doktorantka nie odnosi się do tej kwestii.



- Str. 101 i 110: próbki nr. 402 i 610 wykazały odpowiednio profil ekspresji cząsteczek mRNA i profil genów regulowanych przez MYC bardziej zbliżony do BL niż do BLL_{11q}. Czy wykonano badania FISH wykluczające rearanżację MYC w tych (i pozostałych) przypadkach?

- Str.130, Rys.30: wydaje się, że próbka 185 reprezentuje próbkę 610, i odwrotnie (rozbieżność ryciny z tekstem).

- Numeracja tabel: tabele w rozdziale Wyniki i w Aneksach powinny być numerowane oddzielnie, a nie wymieszane. Byłoby bardziej logicznie, aby po Tabeli 14 nastąpiła Tabela 15, a nie Tabela 25, a Tabele A15-A26 zastąpiono Tabelami A1-12.

Wymienione powyżej uwagi krytyczne, głównie natury technicznej a nie merytorycznej, w żaden sposób nie ujmują wartości samego dzieła, które oceniam wysoko. W mojej ocenie rozprawa doktorska Pani mgr inż. Michaliny Zajdel świadczy o Jej predyspozycji do pracy naukowej, dojrzałości i samodzielności. Osiągnęła zamierzony cel badawczy i udowodniła, że może konsekwentnie pracować nad rozwiązaniem wybranego tematu, oraz że posiada szeroką wiedzę teoretyczną w prezentowanej tematyce. Pani mgr inż. Michalina Zajdel jest pierwszą autorką lub współautorką 5 prac (w tym 4 dotyczących mikroRNA) opublikowanych w międzynarodowych czasopismach. Sądząc po wykazie krajowych i międzynarodowych konferencji, w których uczestniczyła, jest osobą aktywną naukowo. Wyniki badań w przedstawionej do oceny rozprawie doktorskiej zostały wstępnie zaprezentowane na dwóch kongresach, w tym 45tym Kongresie ISOBM (Hamburg, 2018), gdzie zyskały uznanie środowiska naukowego w postaci wyróżnienia.

W związku z powyższym, z przyjemnością stwierdzam, że przedstawiona do oceny dysertacja w pełni spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym i tytule w zakresie sztuki (Dz. U; z 2017 r. Poz. 1789). Mam zatem zaszczyt prosić Wysoką Radę Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie - Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie o jej przyjęcie i dopuszczenie Pani mgr inż. Michaliny Zajdel do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, ze względu na wartość poznawczą prezentowanej rozprawy, jej oryginalność i potencjalne znaczenie kliniczne, wnoszę o wyróżnienie rozprawy. Uważam, że Doktorantka swoją pracą przyczyniła się do znacznego poszerzenia wiedzy w dyscyplinie i wniosła istotny wkład do toczącej się aktualnie międzynarodowej dyskusji o statusie niedawno rozpoznanego podtypu chłoniaka BLL_{11q}.

Iwona Włodarska