



# UNIwersytet Medyczny IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Prof. dr hab. n. med. Krzysztof Kałwak  
Katedra i Klinika Transplantacji Szpiku,  
Onkologii i Hematologii Dziecięcej  
Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu  
ul. Borowska 213, 50-368 Wrocław

Wrocław 2.05.2019

## OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

**mgr biotechnologii medycznej Joanny Madzio**

**pt.: „*GATA3 jako marker stratyfikacji ryzyka niepowodzenia terapii u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL)*”**

Co roku w Polsce odnotowuje się u dzieci ponad 200 nowych przypadków zachorowań na ostrą białaczkę limfoblastyczną (ALL), wśród których 80-85% to pacjenci z ostrą białaczką wywodzącą się z komórek prekursorowych B (BCP-ALL). Aktualnie stosowane programy terapeutyczne, oparte na stratyfikacji ryzyka wznowy, pozwalają na osiągnięcie 5-letniego przeżycia wolnego od niekorzystnych zdarzeń u 85-90% pacjentów, szczególnie w przypadku dzieci w wieku 2-5 lat. Najczęstszą przyczyną niepowodzeń terapeutycznych jest wznowa choroby, która występuje u około 15-20% pacjentów. Wysokie ryzyko wznowy i gorsze całkowite przeżycie jest charakterystyczne dla nowo wyodrębnionego, agresywnego podtypu BCP-ALL, jakim

jest Ph-like ALL. Jest to heterogenna grupa białaczek, charakteryzująca się sygnaturą ekspresji genów zbliżoną do ALL z chromosomem Philadelphia oraz nadaktywnością szlaków sygnałowych promujących proliferację komórek nowotworowych. Głównym bardzo ambitnym celem pracy Doktorantki była ocena związku zmienności *GATA3* z profilem genetycznym oraz fenotypem białaczki u dzieci leczonych z powodu BCP-ALL oraz ocena skutków nadaktywności kodowanego przez ten gen czynnika transkrypcyjnego w linii komórek limfoidalnych. W tym kontekście pilotażowe badania Doktorantki są bardzo interesujące i wręcz nowatorskie z punktu widzenia poznawczego, jak i klinicznego, tym bardziej, że na chwilę obecną w Polsce laboratorium kierowane przez Promotora – P. Prof. dr hab. Wojciecha Młynarskiego spełnia kluczową rolę w stratyfikacji pacjentów z ALL do grup ryzyka. Dla Recenzenta to zatem wielki zaszczyt, by móc oceniać pracę dotyczącą tak istotnego naukowo i klinicznie tematu.

Przedłożona mi do oceny praca pt. „*GATA3 jako marker stratyfikacji ryzyka niepowodzenia terapii u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL)*” liczy 104 strony i posiada typowy dla tego typu rozpraw układ. Składa się ze spisu treści oraz rozdziałów zatytułowanych: *Wstęp, Cele pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja oraz Wnioski*. W dalszej kolejności znajdują się: streszczenie w języku polskim i angielskim, bibliografia, wykaz skrótów oraz spis tabel i ilustracji.

Spis treści jest bardzo przejrzysty i ułatwia czytanie pracy.

Całość *Wstępu* przedstawiona jest w sposób czytelny, w oparciu o najnowsze światowe publikacje. Jest on napisany zrozumiałym językiem i mógłby stanowić pracę pogładową na temat leukemogenezy białaczki B-komórkowej. Znakomita rycina nr 2, będąca modyfikacją ilustracji z artykułu Christine Harrison opublikowanej w *Blood* w 2011 r. odnosi się także do pozycji piśmiennictwa nr 291, która nie istnieje (spis piśmiennictwa liczy 150 pozycji). Ważnym elementem *Wstępu* jest podrozdział dotyczący terapii celowanej w Ph-like ALL. Aktualny stan wiedzy pozwala na identyfikację niekorzystnie rokujących pacjentów z BCP-ALL na podstawie precyzyjnej integracji danych klinicznych oraz oznaczenia defektów genetycznych. Niestety u wielu z nich diagnostyka molekularna jest wykonywana za późno i trwa zbyt długo, by móc zapobiec wznowie białaczki. Badanie GWAS z 2013 roku zidentyfikowało pojedyncze *locus* w genomie, związane z predyspozycją do

zachorowania na Ph-like BCP-ALL, którym jest polimorfizm rs3824662 genu *GATA3*. W związku z powyższym niezmiernie interesujące wydaje się powiązanie tego germinalnego polimorfizmu z patogenezą BCP-ALL i poszukiwanie roli *GATA3* w leukemogenezie, czym w ocenianej przez mnie pracy zajęła się Doktorantka.

Doktorantka z niezwykłą starannością przedstawiła metodologię badań w rozdziale *Materiały i Metody*, który rozpoczyna bardzo cennym i przejrzystym algorytmem postępowania w pracy badawczej. Dobór metod nie budzi zastrzeżeń, jest on adekwatny do postawionych konkretnych celów, a ich opis świadczy o bardzo dobrym opanowaniu praktycznym wykorzystanych technik laboratoryjnych przez Doktorantkę. Doktorantka stosowała wysoce zaawansowane techniki molekularne rozwinięte w światowej klasy laboratorium Prof. Młynarskiego. Do badania włączono znaczną liczbę pacjentów - 861 dzieci, co daje podstawy do opublikowania wyników pracy w czasopiśmie o wysokim współczynniku wpływu. Doskonały warsztat badawczy umożliwił analizę obecności mikrodelecji metodą MLPA, poziomu ekspresji genów *GATA3* i *CRLF2* metodą qPCR oraz poziomu ekspresji białka TSLPR (*CRLF2*) przy użyciu cytometrii przepływowej w szpiku kostnym w momencie rozpoznania choroby. DNA izolowane z krwi obwodowej w okresie remisji choroby posłużyło do genotypowania polimorfizmu rs3824662 genu *GATA3* z wykorzystaniem sond TaqMan. Przez cały okres obserwacji pacjentów zbierano dane kliniczne dzięki współpracy ze wszystkimi ośrodkami onkologii i hematologii dziecięcej w Polsce. Analiza statystyczna została świetnie zaprojektowana i potwierdza tylko doświadczenie naukowo-badawcze Doktorantki i ośrodka łódzkiego. Prawdziwą „wisienką na torcie” jest stworzenie atrakcyjnego modelu komórkowego analizującego funkcjonalną zmienność *GATA3* w warunkach *in vitro*, w tym ocenę skutków nadekspresji tego czynnika transkrypcyjnego w linii komórek limfoidalnych. Rycina nr 8 przedstawia plan eksperymentu w sposób zrozumiały dla przeciętnego czytelnika, co stanowi olbrzymią zaletę pracy. Warto podkreślić, że praca była finansowana z licznych grantów badawczych, w tym min. grantu Narodowego Centrum Nauki i grantu Narodowego Centrum Badań.

Wyniki badań zostały przedstawione opisowo oraz w formie przejrzystych tabel i rycin, w tym bardzo sugestywnych schematów własnego autorstwa np. ryc. 31. Oznaczenie genotypu rs3824662 wyłoniło 44 nosicieli wariantu AA, co stanowiło niebagatelny odsetek ponad 5% badanej grupy. Analiza ekspresji genu *GATA3* wykazała wyższy poziom u nosicieli allelu ryzyka A w stosunku do osób z genotypem

CC. Bardzo interesujące są wyniki badań dotyczące pacjentów z genotypem AA w *locus* rs3824662, którzy byli starsi w chwili diagnozy, gorzej odpowiadali na leczenie i w konsekwencji mieli wyższe ryzyko zgonu. W zakresie somatycznych zaburzeń genetycznych obserwowanych w ALL, tacy chorzy częściej mieli delecje w genie *IKZF1*, delecję *IL3R-P2RY8* oraz wyższe poziomy ekspresji *CRLF2* i *TSLPR*. Wpływ wariantu genotypu AA na chorobę resztkową oraz przeżycie pacjentów okazał się niezależny od klinicznych markerów złej prognozy oraz od występowania charakterystycznych dla Ph-like ALL defektów somatycznych. W tym kontekście odkrycia Doktorantki przyczyniły się do potencjalnej poprawy stratyfikacji dzieci z ALL na grupy ryzyka. O rozsądnym podejściu do wyników pracy świadczy scalenie grup z genotypem CA i CC w dalszych analizach przedstawionych w bardzo sugestywnych rycinach 17A i 17B. Z pozycji recenzenta chciałbym zwrócić uwagę na raczej zbyt odważną interpretację Rycin 18A-D, w których trudno mówić o tendencji do niższego prawdopodobieństwa przeżycia dla nosicieli genotypu AA przy  $p = 0,48$ .

Olbrymią wartość dodaną do pracy stanowi druga część projektu, która miała na celu ocenę skutków nadekspresji *GATA3* w linii komórek limfoidalnych. Dzięki zaangażowaniu Doktorantki i znakomitemu warsztatowi badawczemu na podstawie wyników profilowania ekspresji zidentyfikowano geny kodujące białka zaangażowane w regulację aktywności kinaz białkowych, różnicowanie komórek hematopoetycznych oraz produkcję cytokin biorących udział w odpowiedzi immunologicznej.

W *Dyskusji* Doktorantka analizuje wyniki swoich badań konfrontując własne spostrzeżenia z wnioskami innych badaczy zajmujących się podobnymi zagadnieniami. Należy podkreślić umiejętność korzystania przez nią z piśmiennictwa naukowego oraz jej wiedzę teoretyczną dotyczącą badanych zagadnień. Doktorantka stara się nie tylko zinterpretować obserwacje własne, ale też wyjaśnić przyczyny zaobserwowanych zjawisk. Poczynione przez nią obserwacje i szczegółowe analizy statystyczne mają znaczenie nie tylko poznawcze, ale również kliniczno-praktyczne. Uwagę zwraca niebanalne rozpoczęcie *Dyskusji* poprzez nawiązanie do hipotezy postawionej 5 lat temu na podstawie publikacji Perez-Andreu i wsp. w *Nature Genetics*. Wnioski są odważne, ale oparte na głębokiej analizie. Po lekturze pracy można przypuszczać, że chorzy na BCP-ALL z nadaktywnością *GATA3*, mogą odnieść korzyści kliniczne z leczenia inhibitorami kinazy tyrozynowej, jednak ta hipoteza wymaga potwierdzenia w dalszych badaniach. Oznaczenie genotypu *locus*

rs3824662 może ułatwić identyfikację źle rokujących pacjentów już na wczesnym etapie diagnozy białaczki, co w rezultacie może realnie poprawić wyniki leczenia chorych na BCP-ALL. Autorka wykazuje się także, godnym pochwały, samokrytycyzmem. Słusznie wnioskuję, że niestety, z powodu rzadkiego występowania wariantu AA, w przedstawionym badaniu nie udało się jednoznacznie wykazać, że gorzej rokujący pacjenci mogliby być trafniej stratyfikowani na podstawie genotypu AA.

Najsłabszym elementem tej znakomitej merytorycznie pracy jest jej edycja: czytając tekst dość często spotykałem mniej lub bardziej rażące błędy drukarskie i stylistyczne, Wygląda to, jakby przed oddaniem pracy do druku, nie skorygowano błędów edytorskich w języku polskim.

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr biotechnologii medycznej pt.: „***GATA3 jako marker stratyfikacji ryzyka niepowodzenia terapii u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL)***” spełnia wszystkie wymogi określone w art. 13 ust.1 „Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym”, stawiane rozprawom doktorskim. Mam przyjemność wnioskować do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr biotechnologii medycznej Joanny Madzio do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Drobne uchybienia przedstawione w tekście recenzji w niczym nie obniżają olbrzymiej poznawczej wartości pracy, mającej istotne implikacje kliniczne. Wobec wysokich walorów rozprawy doktorskiej mgr biotechnologii medycznej Joanny Madzio wnioskuję o **wyróżnienie pracy**.

Prof. dr hab. Krzysztof Kałwak

Prof. dr hab. Krzysztof Kałwak  
Specjalista chorób dzieci,  
immunologii klinicznej,  
transplantologii klinicznej,  
onkologii i hematologii dziecięcej.  
3470967