



Recenzja

pracy doktorskiej mgr **Bartłomieja Pawlika**

pt. „Wpływ modulacji sygnału mTOR na ekspresję receptorów immunologicznych punktów kontrolnych w komórkach hematopoetycznych”

przygotowana na prośbę Rady Dyscyplin Nauk Medycznych

Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Hematopoeza to dobrze kontrolowany proces wytwarzania komórek krwi, który zachodzi głównie w szpiku kostnym. Proliferacja i różnicowanie komórek macierzystych znajdują się pod kontrolą czynników wzrostu wytwarzanych przez różne komórki, w tym komórki podścieliska i limfocyty. Czynniki te wiążą się ze specyficznymi receptorami na powierzchni komórek, wpływając nie tylko na ich proliferację oraz różnicowanie, ale także na przeżycie i funkcje dojrzałych komórek. Zaburzenia hematopoezy skutkują rozwojem wielu typów nowotworów. W regulację procesu hematopoezy zaangażowana jest ścieżka sygnałowa PI3K/AKT/mTOR. W ostatnich latach szczególne znaczenie w procesie onkogenezy przypisuje się aktywności kinazy białkowej treoninowo-serynowej mTOR (mammalian target of rapamycin). Białko to jest kodowane przez gen zlokalizowany na chromosomie 1 (region 1p36.2) i pełni kluczową funkcję w kontroli proliferacji, wzrostu i różnicowania komórek. Kinaza mTOR występuje w postaci dwóch funkcjonalnie odrębnych kompleksów białkowych: mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) i mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 2). Kompleks mTORC1 inicjuje translację białek kluczowych dla progresji cyklu komórkowego poprzez fosforylację dwóch najlepiej scharakteryzowanych substratów kinazy rybosomalnej S6 (S6K1, ribosomal protein S6 kinase 1) oraz białka wiążącego eukariotyczny czynnik inicjacji translacji 4E (4E-BP1, Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1). Wydaje się, że podstawową funkcją kompleksu TORC2 jest organizacja cytoszkieletu, jednak w ostatnich latach coraz większe znaczenie przypisuje się jego roli w aktywacji kinazy Akt — głównego stymulatora kompleksu TORC1. Rola kinazy mTOR w ostrej białaczce u dzieci nie została jeszcze dokładnie zbadana. Dotychczas przeprowadzone badania pokazują jednak, że nadekspresja tego białka może mieć istotne znaczenie nie tylko w patogenezie choroby, lecz także w rokowaniu i rozwoju lekooporności u dzieci z białaczką.

W związku z powyższym, temat podjęty przez Doktoranta dotyczący wpływu modulacji sygnału mTOR na ekspresję receptorów immunologicznych punktów kontrolnych w komórkach hematopoetycznych jest aktualny i niezwykle istotny dla hematologów i onkologów. Niniejsza praca była częściowo realizowana w ramach programu Interdyscyplinarnych Studiów Doktoranckich wykorzystujących sekwencjonowanie nowej generacji (NGS) w medycynie spersonalizowanej Studium Medycyny Molekularnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.





Praca doktorska Pana mgr Bartłomieja Pawlika obejmuje 114 stron, na które składa się 12 rozdziałów: wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenie polskie, streszczenie angielskie, bibliografia, wykaz skrótów, spis tabel oraz spis rycin. Poszczególne części pracy są przygotowane w sposób typowy dla rozpraw doktorskich. Całość pracy wzbogacą 3 tabele oraz 15 rycin, które zostały przygotowane starannie, czytelnie i przejrzysto. Doktorant przygotował wykaz skrótów używanych w pracy co znacznie ułatwia czytanie i rozumienie tematyki.

Wstęp zawiera niezbędne informacje służące wprowadzeniu czytelnika w problematykę pracy. Doktorant opisał aktualny stan wiedzy dotyczący procesu hematopoezy, szlaku sygnałowego PI3K/AKT/mTOR i jego roli w nowotworach hematologicznych, związku szlaku mTOR z białkami punktów kontroli immunologicznej oraz opisuje galektyny, które są białkami biorącymi udział w rozwoju wielu nowotworów, m.in. poprzez udział w kancerogenezie, metastazie czy angiogenezie jako punkty kontroli immunologicznej. Bardzo wysoko oceniam ten rozdział pracy – Autor dołożył wszelkich starań, aby szeroko, ale jednocześnie precyzyjnie naświetlić potrzebę przeprowadzenia zaplanowanych badań. Posługuje się płynnością w zapisach rearanżacji genetycznych czy szlaków sygnałowych. Na uwagę zasługują cztery ryciny wykonane samodzielnie przez Doktoranta w programie Biorender, które doskonale obrazują procesy opisywane we wstępie.

Doktorant określił w swojej pracy 3 cele badawcze sformułowane w sposób jasny, zrozumiały i wyznaczają logiczny kierunek prowadzonych badań. Badania dotyczą oceny aktywacji szlaku mTOR, oceny ekspresji galektyny 1 oraz analizy związku pomiędzy szlakiem mTOR a ekspresją galektyny 1 w komórkach defektywnej hematopoezy na podstawie wybranych linii komórkowych ostrych białaczek.

W rozdziale „Materiały i Metody” Doktorant opisuje 4 linie komórkowe wykorzystane w badaniach: jedną linię komórkową dla ostrej białaczki promielocytowej z translokacją $t(15;17)(q22;q11-12.1)$, i trzy linie dla BCP-ALL: pierwsza z translokacją $t(4;11)(q21;q23)$, z obecnością izochromosomu 7 i dodatkowymi aberracjami chromosomowymi: trisomią chromosomów 8 i 18; druga linia z translokacją $t(4;11)(q21;q23)$, z obecnością delekcji $del(7)(p14)$, i trzecia linia z translokacją $t(9;22)(q34.1;q11.2)$. I tutaj z tytułu recenzenta proponowałabym zapisać linie według nomenklatury ISCN, a nie wyłącznie opisowo, czyli w przypadku drugiej linii: kariotyp hiperdiploidalny $47-48,XX,t(4;11)(q21;q23),i(7q),+8,+18$ - ta informacja dostarcza nam wiedzy, że linia komórkowa oprócz $t(4;11)$ ma inny negatywny czynnik prognostyczny delekcję genu *IKZF1* wynikającą z anomalii strukturalnej $izo7q$ i tym samym delekcji ramion krótkich. W opisie umieszczonym w pracy jest mowa o izochromosomie 7, ale nie ma informacji, że dotyczy to ramion długich. Walidację oraz rozszerzenie obserwacji na modelu *in vitro* wybranych linii komórkowych przeprowadzono z wykorzystaniem komórek szpiku kostnego lub krwi obwodowej pacjentów. Grupę badaną stanowiło 13 pacjentów, leczonych w Klinice Pediatrii, Onkologii i Hematologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi z powodu ostrej białaczki limfoblastycznej. Kolejno doktorant opisuje wykorzystane przeciwciała, sondy fluorescencyjne typu TaqMan oraz pozostałe odczynniki laboratoryjne, zestawy komercyjne, aparaturę i sprzęt laboratoryjny, oprogramowanie do analizy wyników. Fragment metodologiczny pracy został





opracowany bardzo szczegółowo i starannie w sposób umożliwiający powtórzenie każdego doświadczenia. Pan Bartłomiej Pawlik dokumentuje w ocenianym rozdziale pracy znajomość wielu technik w tym techniki hodowli komórkowych, izolacji kwasów nukleinowych, PCR w czasie rzeczywistym, czy sekwencjonowanie RNAseq. Zaplanowanie badań oraz ich metodyczne zróżnicowanie wskazuje na rzetelność naukową Doktoranta. Doktorant wykazuje się znajomością nazewnictwa genów, białek i prawidłowo stosuje obecną nomenklaturę.

Rozdział „Wyniki” został przedstawiony obszernie na 28 stronach i podzielony na podrozdziały, z dokumentacją obejmującą liczne ryciny doskonale obrazujące wyniki prowadzonych badań. Doktorant opisuje w każdym podrozdziale otrzymane wyniki z określonego eksperymentu badawczego i wyciąga z niego określony wniosek, który prowadzi do kolejnego eksperymentu przedstawiając ciąg przyczynowo skutkowy. W pierwszym etapie eksperymentu Doktorant dokonał selekcji i wytypował geny, których ekspresja związana jest ze szlakiem PI3K/AKT/mTOR w podtypach ostrej białaczki limfoblastycznej. Tu mam pewną uwagę, pomimo że Autor zamieścił wykaz skrótów na końcu dysertacji to jednak w tym miejscu proponowałabym zamieścić tabelkę zbiorczą przedstawiającą gen, jego położenie na chromosomie wraz z informacją co koduje dany gen. Doktorant uzyskał interesujące wyniki podczas badania oceny wrażliwości komórek białaczkowych na inhibicję szlaku mTOR z wykorzystaniem ewerolimusu. Uzyskane wyniki świadczą, że linie komórkowe ostrej białaczki limfoblastycznej były w różnym stopniu wrażliwe na inhibitor mTOR. Linie komórkowe z fuzją *BCR::ABL1* i rearanżacjami genu *KMT2A* wykazywały silną wrażliwość zależną od stężenia ewerolimusu. Komórki drugiego podtypu *KMT2Ar* z delecją krótkiego ramienia chromosomu 7 wykazywały obniżoną wrażliwość na ewerolimus, natomiast komórki ostrej białaczki promielocytowej odznaczały się relatywnie wysoką aktywnością szlaku mTOR i niewrażliwością na jego inhibicję i ta oporność jest ograniczona jedynie do ostrej białaczki promielocytowej co potwierdzono w kolejnym eksperymencie. Następnie Autor opisuje ocenę ekspresji genów dla białek punktów kontroli immunologicznej w podtypach ostrej białaczki limfoblastycznej oraz wpływ modulacji sygnału mTOR na ekspresję galektyny 1. Ze względu na to, że poziom galektyny 1 w badanych komórkach zależał od podtypu molekularnego białaczki i był ograniczony do komórek z rearanżacjami genu *KMT2A* (linie RS4;11 i SEM-K2) w kolejnym etapie pracy oceniono, czy profil ekspresji genu *LGALS1* zależy od partnerów fuzyjnych genu *KMT2A*. W pierwszej kolejności doktorant ocenił geny partnerskie genu *KMT2A* dla 13 pacjentów w momencie rozpoznania oraz w czasie wznowy choroby, z wykorzystaniem sekwencjonowania nowej generacji (RNA-seq), a następnie zbadał ekspresję *LGALS1* w komórkach pacjentów ze zidentyfikowanymi rearanżacjami w genie *KMT2A*, z wykorzystaniem metody PCR w czasie rzeczywistym. Tu nasuwa się pytanie z jakiego okresu pochodzą próbki od pacjentów z rozpoznaniem białaczki i jakim protokołem byli leczeni? Doktorant wymienia co prawda, że pacjenci mieli wykonany kariotyp i badanie FISH, ale nie doprecyzował typu sondy wykorzystanej do badania. Co więcej zastanawiam się czy wykonywano dodatkowe badania FISH na geny partnerskie dla pacjentów czy ograniczano się do badań przesiewowych z wykorzystaniem sondy typu breakapart dla genu *KMT2A*? W dalszej części badań Autor dokonał oceny potencjalnych czynników transkrypcyjnych mogących regulować ekspresję genu dla galektyny 1 i zależnych





od aktywności szlaku mTOR, w pierwszym etapie zidentyfikowano specyficzne tkankowo czynniki transkrypcyjne o potencjale wiązania do promotora genu *LGALS1* z wykorzystaniem programu funMotifs BD. Jedynym, wspólnym czynnikiem transkrypcyjnym okazał się czynnik SP1. W dalszym toku badań Doktorant wykazał, że w komórkach z rearanżacją genu *KMT2A* dochodziło do statystycznie istotnego spadku ekspresji genu *SP1*, zależnego od stężenia ewerolimusu, odpowiednio w komórkach linii RS4;11.

Zaletą tego rozdziału jest przedstawienie wyników w sposób czytelny i przejrzysty z zawartym zdaniem podsumowującym każdy element badawczy pracy. Chciałabym podkreślić, że tę część pracy oceniam jako wyróżniającą się. Doktorant w sposób zrozumiały, bardzo szczegółowy i należycie staranny przedstawił uzyskane wyniki. Doktorant krok po kroku przedstawia wyniki z każdego eksperymentu, podsumowuje je krótkim wnioskiem, przystępując do kolejnego testu, wykazując się konsekwencją działania planując kolejne doświadczenie. Metodyka badań oraz sposoby analizy danych zostały dobrane właściwie do realizacji zamierzonych celów badań. Do analizy uzyskanych wyników zastosowano adekwatne metody statystyki.

Rozdział „Dyskusja”, który został zawarty na 11 stronach, Pan Bartłomiej Pawlik rozpoczyna od odpowiedzi na pytanie, dlaczego podjęty przez niego problem badawczy jest ważny z punktu widzenia klinicznego. Doktorant omawia wyniki własnych badań w odniesieniu do danych z piśmiennictwa polskiego i światowego. Porównując uzyskane w pracy wyniki z powyższymi, można wysnuć wniosek, że ewerolimus silniej niż rapamycyna wpływa na procesy zatrzymania podziałów komórek podtypu *BCR::ABL1* w warunkach *in vitro*. Rozdział ten stanowi wyraz dużej wiedzy teoretycznej i kompetencji Doktoranta, zrozumienia przeprowadzonych badań i ich krytycznej analizy w stosunku do prac innych grup badawczych. Doktorant stwierdza fakt, że nie zaobserwowano statystycznie istotnych zmian w poziomie ekspresji genu *LGALS1* pomiędzy powyższymi podtypami białaczki z rearanżacją *KMT2A*. Jednakże wykazano, że w podtypie *KMT2A::AFF1* ekspresja *LGALS1* była najwyższa, natomiast w podtypie *KMT2A::MLLT3* najniższa. Można więc przyjąć, że profil ekspresji tego genu zależy od rodzaju partnera fuzyjnego genu *KMT2A*. Doktorant jest świadomy pewnych ograniczeń w swoich badaniach i podkreśla, że analizowana grupa pacjentów była mało liczna, odsetek komórek blastycznych u badanych pacjentów był różny (wahał się w przedziale od 41 do 100%), mała liczba różnorodnych linii komórkowych oraz brak przeprowadzonych badań na komórkach prawidłowej hematopoezy. Istotnym ograniczeniem tej metody był brak możliwości przeprowadzenia bardziej zaawansowanych badań, jak sekwencjonowanie pojedynczych komórek. Powyższe fakty świadczą o dojrzałości naukowej Doktoranta.

Pan Bartłomiej Pawlik właściwie weryfikuje hipotezy badawcze oraz podsumowuje swoją rozprawę 3 wnioskami, ogólnie poprawnie sformułowanymi i wynikającymi z przeprowadzonych badań. Stanowią one wyczerpująca odpowiedź na postawione zadania badawcze. Przedstawione wnioski mają wartość poznawczą oraz kliniczną.





Rozdział „Piśmiennictwo” obejmuje 169 pozycji w większości anglojęzycznych, które stanowią przegląd literatury dotyczącej omawianej tematyki i zostały przez Doktoranta dobrane zgodnie z poruszaną problematyką.

Rozprawę doktorską uzupełniają zwięzłe i przejrzyste streszczenia w języku polskim oraz angielskim. Praca napisana jest poprawną polszczyzną. Drobne błędy stylistyczne i edytorskie nie wpływają na obniżenie wartości pracy. Doktorant wykazał się umiejętnością poprawnego formułowania i rozwiązania aktualnego problemu badawczego, uzyskał interesujące i praktycznie ważne wyniki oraz wykazał się dobrą znajomością problematyki prowadzonych badań. Doktorant osiągnął zamierzone cele, dając dowód umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Przeprowadzone przez Doktoranta badania i uzyskane wnioski są niezwykle interesujące oraz ważne z punktu widzenia poznawczego. Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Bartłomieja Pawlika zatytułowana „Wpływ modulacji sygnału mTOR na ekspresję receptorów immunologicznych punktów kontrolnych w komórkach hematopoetycznych” jest bardzo dobrym opracowaniem, wnoszącym do praktyki klinicznej nową wiedzę i potwierdza fakt, że szlak sygnałowy mTOR odgrywa ważną rolę w defektywnej hematopoezie, prowadzącej do rozwoju nowotworów hematologicznych. Efekty tych badań mogą być zachętą do prowadzenia dalszych eksperymentów na szerszej grupie pacjentów oraz zgodnie z sugestią samego Doktoranta wymagają dodatkowych badań funkcjonalnych.

Podsumowując, rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018r. poz. 1669 z późn. zm.)”. Przedstawioną rozprawę doktorską oceniam bardzo pozytywnie.

Wnoszę do Rady Dyscyplin Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie Pana mgr Bartłomieja Pawlika do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wyniki otrzymane przez Pana mgr Bartłomieja Pawlika w rozprawie doktorskiej są niezwykle obiecujące i pokazują, po raz pierwszy, potencjalny mechanizm regulacji ekspresji galektyny 1 w komórkach ostrej białaczki limfoblastycznej, będącej przykładem nowotworu wywodzącego się z defektywnej hematopoezy. Biorąc pod uwagę znakomite przedstawienie swoich badań oraz uzyskane wyniki zwracam się z wnioskiem o wyróżnienie tej pracy.

Z wyrazami szacunku

dr hab. n. med. Monika Lejman, prof. UML

Samodzielna Pracownia Diagnostyki Genetycznej

II Katedry Pediatrii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Kierownik
Samodzielnej Pracowni Diagnostyki Genetycznej
II Katedry Pediatrii Uniwersytetu Medycznego
w Lublinie
Monika Lejman
Dr hab. n. med. Monika Lejman

Samodzielna Pracownia Diagnostyki Genetycznej
II Katedry Pediatrii
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
20-093 Lublin, ul. prof. Antoniego Gębbi 6
fax. 81-71-747-72-20
tel.: 81-71-85-211, 81-71-85-197

