

Wrocław,

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Karabin “Markery niestabilności genetycznej w ostrych białaczkach limfoblastycznych B-komórkowych u dorosłych w korelacji z klinicznym przebiegiem choroby”

Ostra białaczka limfoblastyczna (ALL) to niezwykle heterogenna choroba, zarówno pod względem podtypów genetycznych i immunofenotypowych, jak i przebiegu klinicznego oraz uzyskiwanych odpowiedzi na leczenie. W ostatnich dwóch dekadach dokonał się ogromny postęp zarówno w diagnostyce, jak i w leczeniu tej choroby. Indywidualizacja leczenia oparta przede wszystkim na wykrywaniu zaburzeń genetycznych i ocenie głębokości odpowiedzi na leczenie za pomocą monitorowania minimalnej choroby resztkowej (MRD) pozwoliła na poprawę odległego przeżycia dorosłych chorych o ponad 10% w porównaniu z dekadą lat dziewięćdziesiątych. Najbardziej spektakularny postęp dokonał się w leczeniu ALL z obecnością chromosomu Filadelfia i/lub genu fuzyjnego *BCR-ABL1* dzięki wprowadzeniu do terapii inhibitorów kinazy tyrozyny (TKI). Niestety odsetek nawrotów ALL u dorosłych chorych pozostaje nadal wysoki, sięgając 40-50% po dwóch latach od zakończenia leczenia. W świetle wyników najnowszych badań szczególnie wysokie ryzyko nawrotu wiąże się z występowaniem podtypu ALL *Ph-like/BCR-ABL1-like*, tj. ostrej białaczki limfoblastycznej charakteryzującej się profilem ekspresji genów podobnym do stwierdzanego w ALL z obecnością chromosomu Ph/genu fuzyjnego *BCR-ABL1*, jednak bez jednoczesnego występowania $t(9;22)/BCR-ABL1$, ani innych zmian cytogenetycznych uwzględnionych w klasyfikacji WHO. Ten typ białaczki charakteryzuje obecność nieprawidłowości genetycznych dotyczące cytoplazmatycznych i receptorowych kinaz tyrozynowych prowadzących do aktywacji szlaków kinazowych ABL lub JAK-STAT. Postęp w diagnostyce tego podtypu ALL może prowadzić w przyszłości do wprowadzenia do standardowego leczenia chorych na ALL *BCR-ABL1-like* inhibitorów

kinaz ABL, JAK, FLT3 lub inhibitorów szlaku mTOR. Do wysokiego ryzyka nawrotu w typie ALL *BCR-ABL1-like*, jak i w ALL *BCR-ABL1+* może w istotnym stopniu przyczyniać się zjawisko niestabilności genetycznej, które stanowi obecnie obszar intensywnych badań naukowych. Wszystko to sprawia, że podjęty przez Doktorantkę temat pracy jest ważny i niezwykle aktualny.

Przedstawiona mi do oceny praca liczy 112 stron i posiada typowy, ogólnie przyjęty układ składając się z rozdziałów: wstęp, założenia i cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, piśmiennictwo. Na początku pracy autorka umieściła spis rycin, wykaz stosowanych skrótów i streszczenia w języku polskim i angielskim. Doktorantka dołączyła również kopię pozytywnej opinii Komisji Bioetycznej przy WUM z marca 2013 roku.

Pracę otwiera wstęp, w którym Autorka na 24 stronach przedstawiła przegląd aktualnego piśmiennictwa i scharakteryzowała badaną problematykę. Omówiła historyczną klasyfikację OBL stworzoną przez grupę FAB, podział immunofenotypowy wg EGIL, oraz dokładnie scharakteryzowała nowy podtyp ALL „*BCR-ABL1-like*” wyodrębniony przez WHO w klasyfikacji z 2016 roku. Omówiła teorię „dwóch uderzeń” w patogenezie ALL, rolę niestabilności genetycznej w progresji choroby, a także przedstawiła dwa typy mutacji mogące prowadzić do tej progresji, tj. zmianę liczby kopii fragmentów DNA (CNA) oraz substytucje pojedynczych nukleotydów (SNV), Doktorantka dowiodła, że posiada bardzo szeroką wiedzę związaną z tematyką i metodyką prowadzonych badań. Rozdział ten jest dobrym przygotowaniem i stanowi uzasadnienie dla wykonanych badań.

Cele pracy zostały sformułowane w sposób jasny i przejrzysty, właściwie charakteryzując hipotezę badawczą.

Doktorantka postawiła sobie następujące zadania:

1. Scharakteryzowanie zmian genetycznych występujących u polskich dorosłych z B-ALL, ze szczególnym uwzględnieniem chorych, u których nie wykrywa się powszechnie występujących genów fuzyjnych, w tym chorych z podgrupy B-ALL wysokiego ryzyka *BCRABL1-like*.
2. Ocena ekspresji mRNA genów kodujących enzymy mutatorowe *RAG2*, *AICDA*, *A3A* i *A3B* jako markerów niestabilności genetycznej.
3. Ustalenie odsetka B-ALL charakteryzującej się niestabilnością genetyczną typu zmiany liczby kopii fragmentów DNA (CNA) w polskiej grupie dorosłych na B-ALL oraz ich potencjalnego związku z ekspresją mRNA enzymów mutatorowych.
4. Analiza korelacji zaburzeń powyższych markerów z parametrami biologicznymi i klinicznymi chorych.

W rozdziale „Materiał i metody” autorka opisuje szczegółowo metody izolacji komórek jądrowych i kwasów nukleinowych oraz wykonywania reakcji odwrotnej transkrypcji. Obszernie opisuje metody zastosowane do wykrywania genów fuzyjnych E2A-pBX1, MLL-AF4, TEL-AML1 oraz BCR-ABL1 wg protokołu BIOMED. Ponadto objaśniła szczegółowo metody wykrywania genów fuzyjnych i mutacji genów charakterystycznych dla ALL *BCR-ABL1-like*, oraz metody badania ekspresji mRNA genów białek kompleksu RAGs, białek rodziny AID/APOBEC oraz CRLF2. Dodatkowo Autorka opisała również metodą MLPA wykrywania mutacji typu zmiany liczby kopii DNA (CNA). Przedstawiła również podstawowe informacje na temat zastosowanych metod analizy statystycznej, podając nazwy użytego pakietu statystycznego oraz rodzaje zastosowanych testów.

Wyniki badań zostały opisane na 30 stronach oraz przedstawione w 22 tabelach i na 9 rycinach.

W podrozdziale Charakterystyka pacjentów Autorka przedstawiła wyczerpująco charakterystykę kliniczną badanej populacji 162 chorych.

Autorka wykazała, że w populacji polskich dorosłych osób chorych na ALL częstość występowania genów fuzyjnych ujętych w protokole BIOMED-1 (*BCR-ABL1*, *MLL-AF4*, *E2A-PBX*, *TEL-AML1*) nie różni się od częstości w innych populacjach chorych. Gen *BCR-ABL1* stwierdziła u 33% chorych, a *MLL-AF4* i *E2A-PBX* u kolejnych 5,2% chorych (tj. każdy z nich u 2,6% chorych). Mutacje typu CNA Doktorantka wykryła u 29% chorych. Mutacje i geny fuzyjne charakterystyczne dla podtypu *BCR-ABL1-like* wykazała u 17/162 chorych (10%).

Przeprowadzona przez Doktorantkę analiza ekspresji genów mutatorowych w odniesieniu do charakterystyki biologiczno-klinicznej wykazała, że wysoka ekspresja genu *A3A* wiąże się z wyższym wiekiem chorych, natomiast wysoka ekspresja genu *A3B* z wyższym odsetkiem blastów z ekspresją CD52. Ekspresja genu *A3B* dodatkowo wykazywała związek z odpowiedzią na przedleczenie steroidami ($p=0,02$). Analiza mutacji typu CNA wykazała, że występują one często w grupie chorych na ALL z *BCR-ABL1* [20/25 (80%) chorych] oraz w grupie chorych na ALL *BCR-ABL1-like* [10/12 (83%) chorych]. Delecję IKZF1 stwierdziła u 68% chorych na ALL z *BCR-ABL1* i 50% chorych na ALL *BCR-ABL1-like*. Ponadto w grupie z delecją *PAX5* wykazała znamienne wyższy odsetek blastów z ekspresją CD20 w porównaniu do grupy bez delecji (mediana odsetka komórek CD20+ 43% vs 18%, $p=0.03$). Dodatkowo w grupie z delecją *EBF1* Autorka stwierdziła wyższą liczbę leukocytów w porównaniu do grupy bez delecji.

Analiza powiązania występowania mutacji typu CNA z ekspresją genów mutatorowych przeprowadzona przez Doktorantkę wykazała związek mutacji typu CNA z wysoką ekspresją RAG2 oraz niską ekspresją A3A. Ponadto autorka porównała przeżycie całkowite (OS) i przeżycie wolne od choroby (DFS) chorych na poszczególne podtypy genetyczne ALL, oraz przeżycie chorych z obecnością i bez obecności markerów niestabilności genetycznej. Doktorantka wykazała, że DFS chorych z mutacjami typu CNA jest krótsze niż chorych bez tych mutacji. Podobnie stwierdziła krótsze OS i DFS chorych z delecją genu *ETV6* w porównaniu z chorymi bez tej delecji, oraz dodatkowo w podgrupie chorych na ALL bez genu *BCR-ABL1* krótsze OS i DFS w przypadku występowania delecji *IKZF1*.

Uzyskane dane zostały poddane analizie w rozdziale „Dyskusja”. Autorka na 12 stronach sprawnie i kompetentnie omówiła wyniki własnych badań w kontekście prac innych autorów. Doktorantka wykazała się zdolnością kojarzenia faktów i dobrą znajomością piśmiennictwa w postaci 150 odnośników literaturowych. W rozdziale tym widać bardzo szeroką i kompleksową znajomość przedmiotu.

Zakończenie stanowi sześć wniosków sformułowanych przez Autorkę.

1. W grupie polskich dorosłych z B-ALL częstość występowania genów fuzyjnych ujętych w protokole BIOMED-1 wynosi: *BCR-ABL1* (33%), *MLL-AF4* (2,6%), *E2A-PBX* (2,6%), *TEL-AML1* (0%) a ich rozkład odsetkowy nie różni się od tego obserwowanego w innych populacjach.
2. Częstość występowania podgrupy wysokiego ryzyka *BCR-ABL1-like* w populacji polskich dorosłych z B-ALL wynosi 10%.
3. Odsetek białaczek charakteryzujących się niestabilnością genetyczną typu CNA w polskiej grupie dorosłych z B-ALL wynosi 29%, w tym chorzy z jedną mutacją typu CNA stanowili 40%, z dwiema mutacjami 31%, z trzema mutacjami 24%, z czterema mutacjami 4%.
4. Wysoka ekspresja kompleksu RAGs wydaje się być markerem niestabilności genetycznej w podgrupie B-ALL z genem fuzyjnym *BCR-ABL1*, w której to grupie ma związek z powstawaniem mutacji typu CNA, szczególnie delecji genu *IKZF1*.
5. Enzymy AID, A3A i A3B mogą pełnić rolę czynnika niestabilności genetycznej, ale ich ekspresja nie jest związana z obecnością mutacji typu CNA tylko prawdopodobnie z mutacjami typu SNV, szczególnie w podgrupie NEG B-ALL.
6. Najlepszym klinicznie markerem stratyfikacji polskich dorosłych z B-OBL jest obecność mutacji typu CNA, a nie ocena ekspresji genów kodujących enzymy mutatorowe. Szczególnie liczba mutacji typu CNA, obecność delecji genu *ETV6* w całości badanej

populacji chorych z B-OBL oraz obecność delecji genu *IKZF1* u chorych bez genu fuzyjnego *BCR-ABL1* wpływa na ryzyko nawrotu białaczki i zgonu chorego.

Magister Karolina Karabin na podstawie przeprowadzonych badań osiągnęła odpowiedź na stawiane pytania, osiągnęła cele pracy.

Na podkreślenie zasługuje opanowanie warsztatu badawczego, niezwykle szeroko zakrojone badania genetyczne w populacji dorosłych chorych na ALL leczonych protokołami Polskiej Grupy ds. Leczenia Białaczek u Dorosłych w sześciu polskich ośrodkach hematologicznych oraz wybitna znajomość tematu zaburzeń genetycznych i zjawiska niestabilności genetycznej w ALL. Praca ta stanowi ważny przyczynek do wiedzy o częstości występowania poszczególnych podtypów genetycznych, zwłaszcza podtypu *BCR-ABL1-like* w populacji polskich chorych. Stanowi ona znaczący wkład w udoskonalenie diagnostyki podtypów genetycznych ALL w naszym kraju, co może mieć szczególne znaczenie i nieść za sobą implikacje terapeutyczne w podtypie *BCR-ABL1-like*.

Z obowiązku Recenzenta poniżej przedstawiam uwagi merytoryczne i redakcyjne na które pragnę zwrócić uwagę Doktorantce przed publikacją wyników przeprowadzonych badań. Badania te bowiem ze względu na ich niezwykle wysoką wartość poznawczą i praktyczną zasługują na publikację, a także na ich kontynuację w ramach działania Polskiej Grupy ds. Leczenia Białaczek u Dorosłych.

Uwagi merytoryczne:

Poniżej przedstawiam główne uwagi krytyczne, które nasunęły mi się podczas lektury rozprawy.

1. Pragnę zwrócić uwagę, że Doktorantka analizowała krzywe przeżycia całkowitego (OS) i wolnego od choroby (DFS) i ich związek z podtypami genetycznymi ALL i markerami niestabilności genetycznej, stąd w podtytułach wyników, w dyskusji i we wnioskach powinna odnosić wyniki przeprowadzonych badań do OS i DFS, a nie do ryzyka nawrotu białaczki i zgonu, których częstości, ani skumulowanego występowania nie analizowała. Autorka dodatkowo nie podała definicji przeżycia całkowitego (OS) oraz przeżycia wolnego od choroby (DFS), tj. nie podała początkowego punktu pomiaru czasu dla OS/DFS (np. rozpoznanie choroby lub rozpoczęcie leczenia) oraz definicji „zdarzenia” (tj. śmierć, wznowa, oporność) odpowiednio dla OS i DFS.

2. Wnioski 1, 2, 3 i 5 są dobrze udokumentowane uzyskanymi wynikami, wynikają z przeprowadzonych badań i odnoszą się do pytań postawionych w celach pracy.
3. Nie jest dla mnie natomiast jasne, dlaczego wniosek nr 4 Doktorantka odnosi jedynie do grupy chorych na ALL z genem fuzyjnym *BCR-ABL1*, a nie do całej grupy badanej. W podrozdziale 4.5.2 i w tabeli 20 opisuje bowiem wyższą ekspresję genu *RAG2* związaną z występowaniem mutacji CNA w całej badanej grupie, a mutacje typu CNA stwierdza zarówno u chorych na ALL z genem fuzyjnym *BCR-ABL1*, jak i typu *BCR-ABL1-like* oraz ALL NEG.
4. Wniosek 6 natomiast powinien odnosić się do prawdopodobieństwa przeżycia całkowitego i przeżycia wolnego od choroby, a nie ryzyka nawrotu i ryzyka zgonu, których Doktorantka nie analizowała.

Pragnę jednocześnie podkreślić, że szczegółowa ocena poprawności doboru metod i wykonania badań molekularnych dla wykrywania poszczególnych zaburzeń genetycznych przekracza moje kompetencje lekarza klinicysty.

Uwagi redakcyjne:

Praca napisana jest starannie, poprawnym językiem bez błędów stylistycznych i interpunkcyjnych. Poniżej wymieniono zauważone drobne usterki redakcyjne, niektóre o charakterze marginalnym lub polemicznym..

1. W rozdziale 2 przedstawiono jedynie cele pracy, stąd tytuł „Założenia i cel pracy” nie jest ścisły, ponieważ założenia w rzeczywistości przedstawiono w rozdziale „Wstęp”.
2. W tabelach od 7 do 19 Doktorantka analizuje medianę odsetka jak przypuszczam komórek białaczkowych z ekspresją antygenu CD56 i CD20 (co wyrażone jest wprowadzeniem znaku % w nawiasie), natomiast w opisie podaje „Mediana liczby komórek...” co sugeruje analizę bezwzględnej liczby tych komórek.
3. W tabelach od 10 do 19 nie jest dla mnie w pełni zrozumiała część dotycząca statystycznego porównania ekspresji genów, mutacji lub delecji między poszczególnymi podgrupami genetycznymi ALL, tzn nie jest czytelne jakim testem i które grupy między sobą Doktorantka porównywała i do czego odnosi się *p* przy poszczególnych podgrupach genetycznych (tzn. np. w opisie wyników do tabeli 14 Doktorantka stwierdza, że „mutacje typu CNA występowały częściej u osób z genem fuzyjnym *BCR-ABL1*”. Nie jest dla mnie jasne czy częstość ta jest wyższa niż w innych podtypach genetycznych, czy też jest wyższa w porównaniu do

wszystkich ALL bez genu fuzyjnego *BCR-ABL1*. Sposób przedstawienie danych w tabeli i poziomu istotności p nie pozwala na zrozumienie tej części analizy, a umożliwia jedynie prześledzenie wyników statystyki opisowej. Uwaga ta odnosi się również do pozostałych tabel, np. tabela 15 i opis: „delecje genu *IKZF1* występowały znamienne częściej u chorych z genem fuzyjnym *BCR-ABL1*).

4. W podrozdziale 4.4.3.4 Doktorantka pisze, że chorzy z niską ekspresją genu *A3B* gorzej odpowiadali na steroidoterapię, podczas gdy z tabeli 13 wynika, że 59 z 67 (88%) chorych z niską ekspresją *A3B* odpowiedziało na steroidoterapię, a tylko 41 z 67 (61%) chorych uzyskało odpowiedź w grupie z wysoką ekspresją *A3B*. Interpretacja wyników byłaby łatwiejsza, gdyby procenty były zliczone w kolumnach, a nie w wierszach (czyli odpowiednio w grupie z niską i wysoką ekspresją genu).
5. W podrozdziale 4.5.1 Autorka nie dokończyła zdania w opisie wyników: „ W badanej grupie zaobserwowano, że u chorych z delecją genu *EBF1* mediana liczby leukocytów w porównaniu z chorymi bez delecji ($13,5 \times 10^9/L$ vs $52,1 \times 10^9/L$; $p=0,02$)”.
6. Liczba i kolejność Wniosków nie odpowiada ściśle liczbie i kolejności sformułowanych Celów, co nieco utrudnia odbiór pracy (przy dużej liczbie wyników można uzyskać zgodność liczby i kolejności Celów z liczbą i kolejnością Wniosków np. poprzez wprowadzenie podpunktów do głównych punktów z Wnioskami).

Wszystkie wymienione wyżej uwagi i niedociągnięcia nie mają istotnego wpływu na wysoką ocenę wartości merytorycznej pracy. Mogą być one z łatwością poprawione podczas przygotowania pracy do druku. Uzyskane wyniki zasługują bowiem, jak wcześniej podkreślałam, na publikację. W realizacji pracy Doktorantka wykazała się dojrzałością naukową, umiejętnością korzystania z piśmiennictwa, planowania badań, ich realizacji z doborem odpowiednich metod badawczych oraz krytycznej analizy poczynionych obserwacji.

Podsumowując, przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Karoliny Karabin “Markery niestabilności genetycznej w ostrych białaczkach limfoblastycznych B-komórkowych u dorosłych w korelacji z klinicznym przebiegiem choroby” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wskazuje na dużą teoretyczną wiedzę Doktorantki oraz umiejętność prowadzenia pracy naukowej. Tym samym praca ta spełnia wszystkie metodologiczne i merytoryczne wymogi stawiane rozprawom doktorskim.

Przedstawioną rozprawę doktorską oceniam wysoko i wnoszę do Wysokiej Rady I Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Karoliny Karabin do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie składam wniosek o wyróżnienie przedstawionej rozprawy doktorskiej.

Anna Czyż
dr hab. n. med.