



**INSTYTUT  
GENETYKI CZŁOWIEKA**  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

*Akceptacja  
H. J.*

Poznań, 10.07.2023

ul. Strzeszyńska 32  
60-479 Poznań

tel. +48/61/657 91 00  
fax +48/61/823 32 35  
e-mail: igcz@man.poznan.pl

[www.igcz.poznan.pl](http://www.igcz.poznan.pl)

Prof. dr hab. Maciej Giefing  
Zastępca dyrektora ds. naukowych  
Kierownik Zakładu Genetyki Nowotworów

## **Recenzja**

### **rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Anny Koppolu pt. „Somatyczne mutacje powiązane z onkogenezą w patogenezie endometriozy”**

Celem przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej jest identyfikacja mutacji somatycznych w tkankach endometrium kobiet chorych na endometriozę. Cel ten doktorantka realizowała poprzez sekwencjonowanie całoeksomowe DNA z homogenizowanych tkanek endometrium a w drugiej części badań, poprzez sekwencjonowanie szerokiego panelu genów w materiale uzyskanym na drodze mikrodysekcji laserowej. W celu rozróżnienia mutacji somatycznych od germinalnych przeprowadzano także sekwencjonowanie DNA pochodzącego z krwi obwodowej pacjentek. Recenzowana rozprawa bardzo dobrze wpisuje się w ekspertyzę zakładu, w którym pracuje doktorantka i który ma niekwestionowaną renomę jeśli chodzi o badania z wykorzystaniem techniki sekwencjonowania następnej generacji. Również wybór tematyki badań jest niewątpliwie trafny. Szacuje się, że endometrioza jest chorobą dotykającą aż 170 mln kobiet na świecie, a więc kilka procent populacji. Skutkiem jest znaczne obniżenie jakości życia wielu kobiet, zmniejszenie szans na posiadanie potomstwa jak również obciążenia ekonomiczne sięgające miliardowych sum w skali globu.

Na wstępie doktorantka stawia trafną hipotezę, że niekontrolowany rozrost endometrium u chorych przypomina w pewnych aspektach rozrost nowotworowy i tym samym zakłada, że u podstaw endometriozy mogą leżeć mutacje somatyczne genów powiązanych z patogenezą nowotworów. Doktorantka zadaje kolejne trafne pytanie dotyczące obecności identyfikowanych mutacji w podtypach endometrium. Dowodem na zasadność stawianej hipotezy są dostępne doniesienia literaturowe o obecności mutacji w tkance endometrium u chorych. Mutacje zaobserwowano uprzednio w takich genach jak *KRAS*, *PIK3CA* czy *ARID1A*. Z drugiej jednak strony, dostępne doniesienia literaturowe pokazują, że jest to temat już częściowo zgłębniony co zmniejsza nowatorskość zarówno hipotezy jak i otrzymanych wyników.

Przygotowana przez Panią mgr Agnieszkę Koppolu rozprawa doktorska liczy 88 stron i jest podzielona w sposób klasyczny na wstęp, cel badań, materiały i metody, wyniki, dyskusję oraz wnioski. Całość rozpoczynają dobrze przygotowane spisy tabel, rycin i skrótów oraz streszczenia przygotowane w języku polskim i angielskim. Rozprawę kończy zaś spis dobrze dobranej i aktualnej, cytowanej literatury zawierający 117 pozycji oraz bardzo istotne w tego typu badań, zgody komisji bioetycznej.

Wstęp rozprawy jest napisany poprawnie. Jest dobrym wprowadzeniem w dalsze części i pod względem merytorycznym dostarcza niezbędnej wiedzy dla zrozumienia dalszych części rozprawy. Co ważne, wstęp w wystarczający sposób obrazuje znajomość przedmiotu przez doktorantkę. Choć jest on momentami napisany trochę nieporadnie językowo np. stosowane są kalki z języka angielskiego takie jak „koncentracja estrogenów” zamiast „stężenie estrogenów”, „dedykowana próbka” zamiast „próbka przeznaczona do” błędne stosowanie terminu „teoria” jako synonimu „hipotezy” czy mylenie słowa „ilość” ze słowem „liczba” dla odpowiednio rzeczowników niepoliczalnych i policzalnych. Są to jednak uchybienia drobne, nie mające zasadniczego wpływu na wartość merytoryczną tego rozdziału. **Tym samym stwierdzam, że rozprawa doktorska w pełni prezentuje dobrą, ogólną wiedzę teoretyczną doktorantki w dyscyplinie nauki medyczne.**

Rozdział poświęcony materiałom i metodom jest przygotowany starannie i zawiera niezbędne informacje umożliwiające prześledzenie prowadzonych eksperymentów. Liczebność grup badanych nie budzi wątpliwości a dużym plusem jest jednorodność badanych grup. Niewątpliwie dobrym wyborem było przejście na pracę z materiałem biologicznym uzyskanym poprzez mikrodysekcję laserową. Decyzja ta umożliwiła otrzymanie interesujących wyników. Niemniej jednak, chciałbym poświęcić kilka słów na ocenę warsztatu eksperymentalnego wykorzystanego w opisanych badaniach. Jest on moim

zdaniem skromny. Doktorantka stosuje w zasadzie tylko jedną technikę biologii molekularnej jaką jest sekwencjonowanie NGS poprzedzone techniką mikrodysekcji laserowej i WGA. Doktorantka niewątpliwie bardzo dobrze opanowała różne warianty NGS o czym świadczy przeprowadzenie walidacji niektórych wyników techniką ADS ale znów obraca się tylko w obrębie wariantów jednej techniki. Szkoda również, że ograniczono się do badania panelu genów w drugiej części badań. Analiza WES mogłaby umożliwić identyfikację nowych, dotychczas niepowiązanych z patogenezą endometriozy genów. Nie rozumiem także dlaczego nie weryfikowano obecności wszystkich zidentyfikowanych mutacji a zawężono walidację tylko do wybranych wariantów. Po stronie edycyjnej, na stronach 44 i 45 można znaleźć powtórzenie jednego akapitu.

Podsumowując tę część rozprawy stwierdzam, że opisane eksperymenty, choć ograniczone do wariantów jednej techniki, są zaprojektowane poprawnie. **Tym samym stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska wskazuje na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez doktorantkę.**

Mam również kilka uwag do części rozprawy poświęconej wynikom. W pierwszej kolejności chciałbym podkreślić wynik wskazujący na statystycznie istotnie wyższą szansę wystąpienia mutacji w genie sprawczym w EK niż w pozostałych genach. Jest to moim zdaniem jeden z najważniejszych wyników otrzymanych w ramach tej rozprawy. Wskazuje on nie wprost na znaczenie badanych genów z grupy nazwanej genami sprawczymi w patogenezie endometriozy. Niestety w tej części rozprawy zabrakło dalszego pogłębienia otrzymanych wyników i lepszego ich zobrazowania. Doktorantka nie przedstawia na jaki fragment kodowanego białka wpływają zidentyfikowane mutacje, choć można było je przedstawić w atrakcyjnej formie graficznej. Nie zastanawia się czy są to zmiany aktywujące czy inaktywujące oraz czy zidentyfikowana zmiana przełoży się na aktywność białka a dalej na patogenezę badanej jednostki chorobowej. Doktorantka nie porównuje zidentyfikowanych mutacji ze zmianami w danych genach opisanymi już w literaturze w innych jednostkach chorobowych. Słabą stroną rozprawy jest także zupełny brak analiz funkcjonalnych. Nie sprawdzono czy zmutowany allel w ogóle ulega ekspresji i dalej czy mutacja wpływa na poziom ekspresji genu. Otwarte pozostaje także pytanie na ile mutacje o niskim VAF mogą przekładać się na rozwój choroby. Bez uwzględnienia tych kwestii, identyfikacja mutacji, choć sama w sobie jest ciekawym wynikiem, może jedynie posłużyć do spekulacji jeśli chodzi o ich wpływ na patogenezę choroby. **Podsumowując tę część recenzowanej rozprawy doktorskiej stwierdzam, że mimo wyszczególnionych uchybień**

**umniejszających jej ocenę, przeprowadzone badania jak i otrzymane wyniki stanowią oryginalne rozwiązanie stawianego problemu naukowego.**

W części poświęconej dyskusji chciałbym podkreślić bardzo dobrze poprowadzoną argumentację za zastosowaniem techniki mikrodysekcji laserowej. W pełni zgadzam się z doktorantką, że jest to jedyne podejście przedanalizacyjne umożliwiające uzyskanie wartościowych wyników w dalszych eksperymentach. Również dyskusja przyczyn rozbieżności w wynikach otrzymanych w pierwszym sekwencjonowaniu i sekwencjonowaniu ADS jest bardzo ciekawa. Podobnie bardzo trafna jest dyskusja na temat wpływu heterogenności badanej tkanki endometrium na uzyskane wyniki jak również uzyskania potencjalnej przewagi ewolucyjnej komórek posiadających zidentyfikowane mutacje. Szkoda, że spekulacje te nie zostały wsparte eksperymentami funkcjonalnymi. Co ważne, Pani mgr Koppolu dyskutuje zarówno wyniki pozytywne ale także zauważa ograniczenia przygotowanej rozprawy, w tym wspomniane już zastosowanie panelu genów w miejsce sekwencjonowania typu WES. Zauważa też konieczność analizy transkryptomu w tego typu analizach.

Całość rozprawy kończą wnioski, które prawidłowo odnoszą się do postawionych celów. Jednak wniosek numer 1 i 2 to bardziej streszczone wyniki niż wnioski. Pierwszy powinien raczej dotyczyć przewagi podejścia eksperymentalnego poprzedzonego mikrodysekcją laserową. Natomiast drugi opisywać co wynika z faktu statystycznie istotnie częstszego występowania mutacji w genach sprawczych. Ostatecznie nie jest jasne jakie wnioski doktorantka wyciąga z otrzymanych wyników opisanych w punkcie pierwszym i drugim.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Agnieszki Koppolu jest pracą ciekawą i pokazującą bardzo dobre opanowanie technik opartych o sekwencjonowanie następnej generacji. Jest niestety zarazem rozprawą o skromnym warsztacie eksperymentalnym i niepogłębionymi wynikami. Niemniej jednak, niektóre otrzymane wyniki niewątpliwie wzbogacają rozumienie podstaw molekularnych patogenezy endometriozy.

**Tym samym stwierdzam, że rozprawa doktorska przygotowana przez mgr Agnieszkę Annę Koppolu 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.)”.

Maciej Giefing

**KIEROWNIK**  
Zakładu Genetyki Nowotworów  
  
prof. dr hab. Maciej Giefing

