



Prof. dr hab. Anna Żaczek
Zakład Onkologii Translacyjnej
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk

Gdańsk 14.08.2023

RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ

rozprawy doktorskiej Pauliny Szadkowskiej pt. *“Application of targeted next-generation sequencing to detect potentially pathogenic alterations in gliomas, circulating tumor DNA and tumor-derived cells”*, której promotorem jest prof. dr hab. Bożena Kamińska-Kaczmarek.

Przedstawiona do recenzji praca dotyczy możliwości wykorzystania sekwencjonowania następnej generacji w diagnostyce glejaków. Adresuje kilka ważnych kwestii, takich jak techniczne wyzwania związane z wykorzystaniem cfDNA od chorych z glejakiem, analiza mutacji w materiale utrwalonym w formalinie, zatopionym w parafinie pochodzącym z trudnych diagnostycznie glejaków dziecięcych czy stabilność profilu mutacyjnego linii pierwotnych w porównaniu do guzów od chorych z glejakiem, z których się wywodzą. Wszystkie te kwestie stanowią obecnie wyzwania, a udoskonalenia metodologiczne badania DNA w tak trudnym materiale jak cfDNA są niezwykle potrzebne. Dlatego podjęcie tematu uważam za jak najbardziej zasadne i ambitne. Przedstawione w pracy badania wpisują się w realizowaną konsekwentnie od wielu lat z sukcesami tematykę zespołu kierowanego przez prof. Bożena Kamińska-Kaczmarek dotyczącą biologii, diagnostyki i leczenia glejaków. Zaplanowane i przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej analizy są aktualne i istotne zarówno z poznawczego, jak i aplikacyjnego punktu widzenia. Poszerzają wiedzę na temat wariantów genetycznych występujących w cfDNA czy glejakach dziecięcych, a udoskonalenia obecnych metod sekwencjonowania cfDNA mogą przybliżyć zastosowanie płynnej biopsji w diagnostyce glejaków.

Oceniając stronę formalną pracy, rozprawę stanowi przygotowane w języku angielskim opracowanie liczące 124 strony. Układ pracy jest typowy dla dysertacji doktorskich w zakresie

nauk eksperymentalnych. Praca obejmuje: spis treści, wykaz skrótów, streszczenie po angielsku i po polsku, wstęp, cele pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, podsumowanie i wnioski, bibliografię oraz wykaz publikacji autorstwa Doktorantki. Z technicznego punktu widzenia rozprawa przygotowana jest bardzo starannie, błędów i literówek jest niewiele. Posiada czytelną oprawę graficzną i dobrze opracowane ryciny. Praca opatrzona jest listą 177 aktualnych, związanych z tematem pozycji literaturowych. Układ pracy jest logiczny i nie budzi zastrzeżeń, co dowodzi umiejętności Doktorantki do właściwego przedstawienia problemu naukowego i sposobu jego rozwiązania.

Przechodząc do oceny merytorycznej, pracę rozpoczyna **Wstęp**, przedstawiający analizowane w pracy zagadnienia, który dobrze wprowadza w tematykę badań, uzasadniając celowość ich podjęcia. Autorka omawia kolejno badania nad poznaniem ludzkiego genomu, udoskonalenia w technikach sekwencjonowania DNA i RNA, sekwencjonowanie następnej generacji i dostępne platformy sekwencjonowania, sposób analizy danych, zmiany w obrębie DNA związane z nowotworzeniem i bazy danych je opisujące, charakterystykę glejaków, płynną biopsję i jej zastosowanie w diagnostyce guzów mózgu. Rozdział ten dowodzi biegłości Doktorantki w tematyce badań, jak również pokazuje, że jest zorientowana w bieżącym piśmiennictwie naukowym.

Cel pracy został dobrze wyjaśniony i właściwie zdefiniowany. Głównym zamierzeniem Doktorantki było zastosowanie ukierunkowanego sekwencjonowania następnej generacji do wykrywania patogennych i potencjalnie patogennych zmian w DNA glejaków, linii pierwotnych pochodzących z guza oraz krążącym DNA. Zamierzenie to było realizowane przez szereg celów szczegółowych dotyczących gromadzenia materiału, optymalizacji metod, analizy zmian genetycznych w materiale z guzów mrożonych oraz utrwalonych w formalinie, zatopionych w parafinie (FFPE), cfDNA i kultur komórkowych.

Rozdział **Materiały i Metody** został przygotowany starannie i szczegółowo. Szczególnie chciałabym docenić schemat przedstawiający przebieg projektu rozpoczynający cały rozdział, który czytelnie pokazuje schemat wykonywanych badań. Wykorzystywany w projekcie materiał był różnorodny; obejmował materiał z guzów mrożonych oraz FFPE, cfDNA i kultur komórkowych. Do badań włączono 2 kohorty: 126 dorosłych i 35 pacjentów pediatrycznych oraz 8 hodowli pierwotnych. Ze względów technicznych analizę cfDNA można było wykonać dla 84 chorych. Stosowane metody obejmowały izolację DNA i cfDNA, przygotowanie bibliotek, analizę bioinformatyczną oraz statystyczną. Schemat wykonywanych analiz był więc standardowy, natomiast wiele z etapów (izolacja cfDNA, przygotowanie biblioteki i ukierunkowane sekwencjonowanie) zostało ulepszonych w ramach pracy doktorskiej. Autorka wykazała się również sprawnym warsztatem bioinformatycznym i umiejętnością zastosowania odpowiednich podejść przy analizie materiału z guza, germinalnego DNA i cfDNA.

Podsumowując tę część pracy, metodyka była dobrana w sposób pozwalający na realizację wyznaczonych zadań, stosowana bardzo świadomie i udoskonalona, gdzie było to zasadne i możliwe. Opis metod został przygotowany starannie, pozwala zrozumieć i powtórzyć wykonane eksperymenty. Świadome i umiejętne stosowanie właściwych metod badawczych i narzędzi bioinformatycznych potwierdza dobre przygotowanie Doktorantki do samodzielnej pracy naukowej.

Lektura tej części nasunęła mi następujące pytania:

- Jakie były kryteria włączenia chorych do badania? Czy wiadomo jaki typ molekularny reprezentują analizowane guzy? Czy są dostępne dane o przebiegu choroby/odpowiedzi na leczenie, by móc je odnieść do zidentyfikowanych zmian molekularnych w cfDNA?
- Jaki był współczynnik sukcesu w wyprowadzaniu hodowli pierwotnych? Czemu 2 linie były hodowane jako przylegające?
- Jakie możliwe konsekwencje może mieć stosowanie różnych genomów referencyjnych (hg38 i hg19) przy analizie DNA guzów i cfDNA?

Z ciekawością czytałam część pracy prezentującą **Wyniki**. Poczynione obserwacje są oryginalne i dostarczają nowych danych na temat możliwości zastosowania ukierunkowanego sekwencjonowania nowej generacji do analizy cfDNA w glejakach. Doświadczenia zostały dobrze zaplanowane, a ich dokumentacja przedstawiona rzetelnie. Analiza cfDNA pochodzącego z krwi, udoskonaloną w ramach pracy doktorskiej metodą badawczą, pozwoliła wykryć potencjalnie patogenne warianty w 37 z 84 próbek cfDNA, co stanowi spore osiągnięcie. W cfDNA wykryto spektrum potencjalnie patogennych zmian genetycznych, które nie były wykrywalne w materiale z guza. Na szczególne uznanie, według mnie, zasługuje podjęcie dodatkowych analiz, takich jak analiza cfDNA przed i po leczeniu czy studium przypadku dotyczące analizy cfDNA z krwi pobranej w różnych lokalizacjach. Zastosowanie ukierunkowanego NGS do DNA z wycinków guza FFPE pokazało możliwość zidentyfikowania potencjalnych patogennych zmian genetycznych w słabo zdiagnozowanych glejaków dziecięcych. Jednak ograniczeniem tych badań jest brak referencyjnego genomowego DNA np. z krwi. Ciekawych wyników dostarczyło badanie spektrum mutacyjnego linii komórkowych pochodzących z glejaków w odniesieniu do guzów pierwotnych w warunkach normoksji i hipoksji, wskazując zasadniczo stabilność profili wariantów i tylko niewielkie różnice pomiędzy nimi. Do tej części miałabym następujące uwagi i pytania:

- Fig R1a. Zatytułowana jest „% of patients at different ages”, natomiast chyba nie prezentuje odsetka pacjentów, a inną miarę? Poproszę o komentarz
- Czy zależność stopnia złośliwości G od wieku przedstawiona na FigR2 była znamienna statystycznie?
- Na czym polegały różnice w zbieraniu materiału klinicznego w różnych ośrodkach prowadzące do różnej ilości uzyskiwanego DNA?

- Czy tylko nowotworowe komórki macierzyste mogą prawdopodobnie uzyskać mutacje podczas hodowli komórkowej?

Na koniec w **Dyskusji** Autorka w sposób dojrzały i krytyczny dyskutuje wyniki własne na tle danych literaturowych. Ta część pracy pokazuje dobrą znajomość i płynne poruszanie się Doktorantki w tematyce związanej z prowadzonymi badaniami. Jednocześnie wybrzmiewa świadomość ograniczeń stosowanych metod i krytyczne podejście do uzyskanych wyników, co świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki.

Cele pracy zostały z powodzeniem zrealizowane, a uzyskane wyniki pokazują duży potencjał celowanego sekwencjonowania w udoskonaleniu diagnozowania i lepszym doborze terapii dla chorych z glejakiem, potwierdzając, że płynna biopsja może stanowić obiecujące narzędzie diagnostyczne, komplementarne do tradycyjnej biopsji. Doktorantka podjęła się trudnego tematu, wiążącego się zarówno z wyzwaniem technologicznym obecnie istniejących metod, jak i koniecznością gromadzenia materiału klinicznego odpowiedniej jakości, co nigdy nie jest łatwe. Rezultatem pracy są ciekawe wyniki i solidny warsztat badawczy, który będzie mógł służyć dalszym badaniom. Doktorantka jest współautorką 6 publikacji, w tym pierwszą autorką publikacji zawierającej część wyników prezentowanych w pracy doktorskiej: *Szadkowska P, Roura AJ, Wojtas B, Wojnicki K, Licholai S, Waller T, Gubala T, Zukowski K, Karpeta M, Wilkus K, Kaspera W, Nawrocki S, Kaminska B. Improvements in Quality Control and Library Preparation for Targeted Sequencing Allowed Detection of Potentially Pathogenic Alterations in Circulating Cell-Free DNA Derived from Plasma of Brain Tumor Patients. Cancers 2022, 14, 3902.*

Podsumowując, uważam, że uzyskane wyniki stanowią ważne naukowo osiągnięcie, a Autorka rozwiązała postawiony problem badawczy i potrafiła poprawnie przedstawić efekty swojej pracy w rozprawie doktorskiej. Wykazała się wiedzą, wnikliwością badawczą, umiejętnym wykorzystaniem odpowiedniego warsztatu badawczego oraz umiejętnością prezentacji, interpretacji i dyskusji uzyskanych wyników. Stwierdzam, że przedstawiona rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w dyscyplinie oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, a tym samym rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630). Dlatego wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Nenckiego o dopuszczenie Pani mgr Pauliny Szadkowskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego. Równocześnie, biorąc pod uwagę wysoką wartość merytoryczną rozprawy oraz częściowo już opublikowane wyniki pracy, zwracam się do Wysokiej Rady z wnioskiem o wyróżnienie ocenianej pracy.

Zakład Onkologii Translacyjnej
Gdański Uniwersytet Medyczny
prof. dr hab. Anna Żaczek



Klerownik



Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Ocena rozprawy doktorskiej Pauliny Róży Szadkowskiej BSc, pt.: „Application of targeted next-generation sequencing to detect potentially pathogenic alterations in gliomas, circulating tumor DNA and tumor-derived cells”.

Diagnostyka medyczna oparta na technologii wysokoprzepustowego sekwencjonowania (Next Generation Sequencing - NGS) jest bez wątpienia przyszłością medycyny spersonalizowanej. Zastosowanie tej technologii w diagnostyce, jest zasadniczo limitowane jakością materiału klinicznego, na którym analizy te są przeprowadzane. Dlatego też, podjęcie przez doktorantkę próby oceny przydatności klinicznej testów opartych na technologii NGS, w szeroko rozumianej diagnostyce guzów mózgu, jest wysoce uzasadnione. Wybór guzów mózgu jako materiału do badań jest szczególnie uzasadniony, gdyż diagnostyka tego typu guzów, oparta na biopsji płynnej jest znacząco utrudniona przez barierę krew-mózg.

Ogólna ocena formalna:

Przekazana do recenzji rozprawa liczy 124 strony i składa się z następujących części: podziękowań, spisu treści, listy skrótów użytych w pracy, streszczeń w języku angielskim i polskim, wprowadzenia, opisu celów pracy, opisu materiałów i metod, rezultatów, dyskusji, podsumowania, listy referencji i listy publikacji naukowych Doktorantki. Praca napisana jest w języku angielskim, a jej układ jest standardowy dla tego typu prac. Doktorantka nie wykazała w dostarczonym tekście informacji, jaki był jej wkład w cytowane na końcu rozprawy publikacje. Niemniej jednak fakt, iż Doktorantka jest współautorką pięciu publikacji i pierwszą autorką jednej z nich, wskazuje na wysoki poziom przygotowania kandydatki do pracy naukowej i nabycie umiejętności publikowania wyników swoich badań.

Ocena kluczowych części rozprawy:

Streszczenia:

Streszczenia w języku polskim i angielskim dobrze prezentują problem, jaki doktorantka adresuje w pracy, a także zakres pracy, jak i zarys wyników rozprawy.

Wstęp teoretyczny:

Wstęp teoretyczny do dysertacji jest skonstruowany zgodnie ze standardami tego typu opracowań. Doktorantka rozpoczyna go sekcją historycznego przeglądu badań nad ludzkim genomem i znaczenia sekwencjonowania nowej generacji w tych badaniach. W następnych sekcjach charakteryzuje postępy w technologiach sekwencjonowania nowej generacji. Zaczynając od sekwencjonowania Sangera, o którym autorka konkluduje „Sanger sequencing is a parallel method for confirming sequence variants and it can provide a ground against which the NGS assay can be benchmarked and validated”, jednakże nie wyjaśnia, dlaczego, a to wyjaśnienie powinno znaleźć się w tekście rozprawy. Następną częścią wstępu jest opis technologii masowego sekwencjonowania. Opis tej technologii jest szczegółowy, co pokazuje, iż kandydatka podczas pracy doktorskiej nabyła dużą wiedzę nie tylko w kwestii pracy z technologiami w laboratorium, ale także w sposobach analizy danych i bazach danych, używanych do analizy i interpretacji wyników badań otrzymywanych dzięki technologiom NGS.

W następnej części wstępu autorka przechodzi do opisu obecnego stanu wiedzy na temat guzów mózgu. Opis ten powinien być bardziej szczegółowy, szczególnie znaczenie aberracji genomicznych z „Figure I7” dla przebiegu choroby powinien tu się znaleźć. Poszczególne części Figury I7 są także nieadekwatnie zreferencjonowane w tekście, co przekłada się na barak czytelności tej ryciny. Autorka również niewystarczająco dokładnie przedstawia znaczenie kliniczne wspomnianych klasyfikacji guzów, na przykład klasyfikacji opartej o sekwencjonowanie RNA. W sekcji tej brakuje również opisu klasyfikacji opartej o profilowanie metylacji guzów, a biorąc pod uwagę znaczenie profilowania zmian epigenetycznych w diagnostyce guzów mózgu, wstęp byłby bardziej kompletny, gdyby taka sekcja się tu znalazła.

Następna część wstępu to opis konceptu biopsji płynnej, zilustrowany przez autorkę Figurą I8. Niektóre ze wspomnianych w tej sekcji i przedstawione na rycinie źródeł cfDNA, są kontrowersyjne i dyskusja dowodu naukowego, na to czy i w jakiej ilości cfDNA może pochodzić z tych źródeł, powinna znaleźć się w tej sekcji. Podobnie, opis konceptu biopsji płynnej powinien być bardziej wyczerpujący.

Podsumowując, zakres wiedzy i zagadnień opisanych w tej sekcji jest adekwatny i autorka wykazała w tej części rozprawy potrzebę prowadzenia badań opisywanych w dysertacji. We wstępie występują błędy językowe i techniczne takie jak barak referencji do niektórych stwierdzeń, ale najprawdopodobniej wynikające z przeoczenia.

Cel pracy:

Doktorantka w tej sekcji definiuje, po krótkim wstępie, siedem celów pracy doktoranckiej, którymi są: zebranie materiału do badań, optymalizacja procedur eksperymentów, przeprowadzenie detekcji m w materiale z płynnej biopsji, detekcja zmian genetycznych w liniach komórkowych wyprowadzonych z guzów, ewaluacja zmian genetycznych w guzach pediatrycznych i ocena limitacji użytych metod. Dwa ostatnie cele są w mojej opinii zbieżne i w zasadzie opisują jeden cel, ale całość tej sekcji adekwatnie przedstawia ambitne plany Doktorantki.

Materiały i Metody:

Doktorantka rozpoczyna tą sekcję od ryciny ilustrującej przebieg projektu. Koncept ten uważam za bardzo dobry, niemniej jednak autorka powinna też opisać każdy z sześciu punktów projektu przedstawionych na ilustracji w tekście. Następną część tej sekcji to, adekwatna do potrzeb dysertacji, charakterystyka dwóch kohort pacjentów z projektu, ale barm tu opisu roli autorki w rekrutacji, a jeden z celów jakie autorka postawiła sobie w projekcie to uczestnictwo w rekrutacji pacjentów. Następnie autorka opisuje sposobu wyprowadzania linii komórkowych oraz izolacji DNA i przechodzi do opisu dwóch sposobów przygotowania biblioteki do sekwencjonowania w zależności od rodzaju próbki. Uzasadnienie wyborów modyfikacji metod do źródła materiału jest wyczerpujące. W tej sekcji autorka charakteryzuje też panele genów, które użyła do sekwencjonowania i dyskutuje, dlaczego wybrane panele genów są różne. Ta dyskusja zasługuje moim zdaniem na osobną sekcję. Ostatnie rozdziały to wyczerpujący opis metod bioinformatycznych, jakich autorka użyła do analizy danych.

Podsumowując, analizowana sekcja zawiera adekwatny opis materiałów i metod użytych w projekcie. Autorka tylko w kilku miejscach wspomina o współpracy z innymi naukowcami przy wykonywaniu eksperymentów (współpraca z dr Gózdź). Tak więc zakładając, że zasadniczo większość eksperymentów i analiz opisywanych w tej sekcji została wykonana przez autorkę, sekcja ta pokazuje ogromny wkład pracy włożonej przez autorkę w opisywane eksperymenty, który jest na poziomie adekwatnym do poziomu dysertacji doktorskiej.

Omówienie wyników:

Następne 37 stron rozprawy to prezentacja rezultatów, rozpoczynająca się od opisu grup pacjentów jakie Doktorantka zrekrutowała do projektu (sekcje 4.1. i 4.2). Niestety, z tego opisu także nie można wyczytać jaki był wkład autorki w rekrutację pacjentów.

We sekcjach 4.3, 4.4, 4.5 Doktorantka dyskutuje analizy jakości DNA z różnych źródeł, tekst pokazuje zrozumienie przez Autorkę limitacji jaką jest jakość materiału w jej eksperymentach.

W sekcji 4.6 autorka opisuje wyniki jakie uzyskała z sekwencjonowania DNA, wyizolowanego z guzów i krwi pacjentów. Opis wyników, jak i wizualizacja są adekwatne do prezentowanych rezultatów. Wyniki, które doktorantka uzyskała są generalnie spójne z wcześniej opublikowanymi rezultatami. To świadczy, że metody stosowane przez Doktorantkę w eksperymentach są adekwatne i ryzyko fałszywie dodatnich i ujemnych rezultatów jest niskie, co jest szczególnie ważne w technologiach NGS, gdzie nawet zmiana algorytmów analizy danych może prowadzić do fałszywie dodatnich lub ujemnych rezultatów. Ciekawe są też rezultaty zaprezentowane w sekcji 4.6.3, pokazujące efektywność zastosowania płynnej biopsji do monitorowania efektywności resekcji guza. W następnej sekcji Doktorantka przedstawia wyniki sekwencjonowania cfDNA, jednak zestawia je z wynikami sekwencjonowania guza i DNA wyizolowanego z krwi. Doktorantka prawidłowo prowadzi tu dyskusję, co do przyczyn niezgodności wyników. Użycie w analizie danych algorytmu, opisane w sekcji 4.6.5 pokazuje, że autorka śledzi rozwój metod analizy danych, które dynamicznie się zmieniają i umie je stosować. Konkluzja sekcji 4.6.6. jest interesująca, ale przyczyny, dlaczego rezultaty, jakie Doktorantka otrzymała z sekwencjonowania cfDNA i DNA guza są do tego stopnia rozbieżne, że wymagają dokładniejszej dyskusji. Wyniki eksperymentu opisanego w sekcji 4.7 są oparte o interesującą hipotezę, ale autorka powinna bardzo mocno w opisie zasygnalizować, że wyniki oparte na jednym przypadku nie są konkluzywne, szczególnie że poświęca dużo tekstu na szczegółowy opis aberracji jakie znalazła. Interesujące rezultaty przedstawia także sekcja 4.8, choć znowu za obszerny opis funkcji poszczególnych zidentyfikowanych aberracji w tekście utrudnia czytanie tekstu. W tej sekcji brakuje kwantyfikacji zaobserwowanych różnic i podobieństw między eksperymentami, ponieważ trudno wyciągać wnioski z rycin pokazujące różne kolory. Ostatnia sekcja rezultatów to omówienie aberracji genomicznych jakie autorka zidentyfikowała w guzach pediatrycznych. Sekcja jest napisana zrozumiale, ale omawianie funkcji poszczególnych zidentyfikowanych wariantów utrudnia czytanie. Ten opis powinien pojawić się w dyskusji.

Dyskusja:

Ta sekcja dysertacji składa się z czterech części, brak części 5.4 jest chyba błędem w indeksowaniu. W pierwszej części dyskusji autorka podsumowuje wyniki sekwencjonowania materiału pobranego od dorosłych pacjentów w kontekście danych literaturowych. Autorka konkluduje, iż nie ma zasadniczych różnic we frekwencji aberracji genetycznych w kohorcie badanych polskich pacjentów, a opublikowanymi danymi co waliduje poprawność przeprowadzonych analiz. Autorka charakteryzuje tu także główne aberracje oraz pochyła się nad wariantami które zidentyfikowała, a które nie były wcześniej raportowane, poprawnie dochodząc do wniosku, iż na przykład wariant w genie *AKAP9* może być specyficzny do polskiej populacji pacjentów. W tej sekcji brak jednak dyskusji limitacji technologicznych przeprowadzonych eksperymentów, które niewątpliwie mają wpływ na precyzję otrzymanych wyników, a także znaczenia faktu, w jakim typie materiału wariant został wykryty.

W sekcji drugiej dyskusji autorka postuluje, iż rezultaty sekwencjonowania, które otrzymała pokazują, iż w przeciwieństwie do danych literaturowych i konsensusu w środowisku, sekwencjonowanie DNA wyizolowanego z biopsji płynnej może być użyteczne w diagnostyce guzów mózgu. Doktorantka wymienia tu modyfikacje protokołu eksperymentu, które zastosowała, lecz nie dyskutuje każdej z modyfikacji. Jest zrozumiale, że dyskusja poprawności zastosowanych modyfikacji jest trudna w wypadku, gdy konsensus opiera się na negatywnych danych, ale możliwa jest moim zdaniem dyskusja

samych modyfikacji do protokołu i ich zalet w kontekście metodologicznym. Szczególnie, iż zasadnicza większość wykrytych aberracji nie została zidentyfikowana w DNA guza, więc konkluzja, iż cfDNA reprezentuje dobry obraz mutacji guza powinna być traktowana bardzo ostrożnie, pomimo iż autorka cytuje rezultaty wcześniejszych badań pokazujące podobny fenomen. W tej sekcji autorka dyskutuje ogromną ilość danych literaturowych, co potwierdza jej doskonałą znajomość najnowszych badań w dziedzinie, ale nie odnosi rezultatów większości cytowanych prac do wyników jej badań, a to powinno być sednem dyskusji.

W kolejnej sekcji autorka dyskutuje i prawidłowo konkluduje, iż wyniki jej badań pokazują użyteczność diagnostyczną linii komórkowych wyprowadzonych z guza, jak również odnosi się do limitacji tego modelu, dyskutując, iż niektóre aberracje genetyczne jakie znalazła w liniach komórkowych nie były wykryte w guzach, z których linie pochodziły. Brak tu konkluzji co do wpływu dwóch typów warunków, w jakich kultury komórkowe były prowadzone, na wyniki sekwencjonowania.

W ostatniej sekcji dyskusji autorka dyskutuje fakt, iż pomimo niskiej jakości DNA izolowanego z blozków parafinowych, wyniki które otrzymała pokazują użyteczność NGS w badaniu mutacji w tym materiale. Sekcja dyskusji nie zawiera niestety dyskusji rezultatów z sekcji 4.6.3, czy sekcji 4.6.6., niemniej jednak ta część rozprawy spełnia standardowe wymogi, według których tego typu tekst powinien być napisany.

Podsumowanie i konkluzje:

W tej sekcji Autorka odnosi się do siedmiu celów pracy, jakie postawiła sobie na początku rozprawy. Poszczególne punkty tej sekcji nie odpowiadają wprost punktom z list celów pracy co utrudnia ocenę spójności obydwu sekcji. Niemniej jednak po głębszej analizie podsumowanie odpowiada celom jakie doktorantka sobie postawiła.

Referencje

Rozprawa zawiera 177 referencji do literatury z których trzy to publikacje z listy publikacji autorki przedstawionych w następnej sekcji rozprawy.

Publikacje:

Rozprawę kończy lista sześciu publikacji z których pierwsze trzy są cytowane w rozprawie. Doktorantka jest pierwszym autorem na jednej z publikacji. Dorobek naukowy Doktorantki przedstawiony w tych publikacjach, pokazuje, iż w czasie pracy nad projektem doktorskim autorka zdobyła adekwatne do poziomu doktora nauk, doświadczenie w publikowaniu rezultatów swojej pracy naukowej.

Ogólne uwagi i komentarze:

Podsumowując, na podstawie przedstawionej dysertacji oceniam pozytywnie poziom metodologicznego i merytorycznego przygotowania Doktorantki do przyszłej pracy naukowej. Na szczególną uwagę zasługuje znajomość pracy laboratoryjnej i analiz bioinformatycznych jakie Doktorantka zaprezentowała w rozprawie. Na wyróżnienie zasługuje także bardzo wysoki poziom znajomości literatury w dziedzinie zaprezentowany przez Doktorantkę. Tekst rozprawy zawiera błędy językowe, które w niektórych punktach utrudnią czytanie tekstu, ale mając na uwadze, że język rozprawy nie jest ojczystym językiem autorki, jestem przekonany, iż Doktorantka pokona tę limitację w przeszłej pracy naukowej.

Uwagi końcowe

Stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska „Application of targeted next-generation sequencing to detect potentially pathogenic alterations in gliomas, circulating tumor DNA and tumor-derived cells” spełnia wszystkie wymagania Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Nenckiego o dopuszczenie Pauliny Róży Szadkowskiej BSc do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Z poważaniem



Dr hab. med. Tomasz K. Wojdacz prof. PUM

Kierownik Samodzielnej Pracowni Epigenetyki Klinicznej

Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Szczecin 16-08-2023



Recenzja pracy doktorskiej Pani Pauliny Szadkowskiej pt. "Application of targeted next-generation sequencing to detect potentially pathogenic alterations in gliomas, circulating tumor DNA and tumor-derived cells" wykonanej pod kierunkiem prof. Bożeny Kamińskiej-Kaczmarek w Pracowni Neurobiologii Molekularnej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN.

Rozwój nowych technik sekwencjonowania kwasów nukleinowych i adaptacja tych metod w ochronie zdrowia, głównie u pacjentów onkologicznych, umożliwia identyfikację mutacji w tkance nowotworowej i dobór precyzyjnych metod terapeutycznych z coraz szerszego wachlarza leków celowanych. W leczeniu onkologicznym dużym wyzwaniem jest monitorowanie jego skuteczności, głównie przez okresowe pomiary parametrów biochemicznych i użycie technik obrazowania. Współcześnie podejście to jest uzupełniane próbami poszukiwania markerów obecności nowotworu przez pomiar w pobranych nieinwazyjnie płynach ustrojowych, najczęściej krwi obwodowej, uwalnianych przez komórki nowotworowe kwasów nukleinowych, białek i metabolitów. Tak zwana płynna biopsja stała się złotym galem zarówno dla przemysłu biofarmaceutycznego jak i środowiska akademickiego opracowującego metody diagnostyczne, terapeutyczne, monitorujące i do wczesnego wykrywania nowotworów. W nurt tych innowacyjnych badań wpisuje się przekazana mi do oceny dysertacja praca Pani Pauliny Szadkowskiej i zespołu wykonawców pod kierownictwem prof. Bożeny Kamińskiej-Kaczmarek.

Praca napisana jest w języku angielskim i ma typowy układ, na który składa się wprowadzenie, opisu materiału i metod, prezentacji wyników i ich dyskusji. Praca poprzedzona jest spisem treści i skrótowców oraz streszczeniem w języku polskim i angielskim.

W pierwszych czterech podrozdziałach wstępu przedstawiono rys historyczny rozwoju i udoskonalania technologii sekwencjonowania DNA, która obecnie jest kołem zamachowym postępu w badaniach biomedycznych. Doktorantka wspomina istotne kamienie milowe, w tym: ukończenie The Human Genome Project, wprowadzenie sekwencjonowania masowego następnej generacji (NGS), równoległy rozwój narzędzi bioinformatycznych, a następnie szerokie sekwencjonowanie egzomów i genomów ludzkich, co przelożyło się na pełniejsze zrozumienie zmienności genetycznej człowieka. W tej części Doktorantka poświęciła również dużo miejsca na opisanie zasad działania technologii sekwencjonowania przez syntezę na przykładzie platformy Illumina, przy okazji podając inne, alternatywne techniki obecne na rynku. **W opisie tych technologii pojawią się drobne nieścisłości merytoryczne, jak ta na stronie 19 „nanopore-based DNA sequencing” jest oferowany przez Oxford Nanopore a nie BGI lub na stronie 22 nie „PGM technology” a „Torrent technology”. Przy okazji wskażę, że na stronie 15 wkradł się homofoniczny błąd w postaci „a ship Dolly” zamiast „a sheep Dolly”.** W kolejnym podrozdziale opisano ogólną metodykę procesowania danych z sekwencjonowania NGS, w tym mapowanie i wywoływanie wariantów DNA, na przykładzie DNA komórek nowotworowych oraz przedstawiono wybrane genomyczne bazy danych służące do interpretacji

NARODOWY INSTYTUT ONKOLOGII IM. MARII SKŁODOWSKIEJ-CURIE – PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY
02-781 WARSZAWA, ul. W.K. ROENTGENA 5,

Centrala Tel.: +48 22 546 20 00
Centrala Fax: +48 22 546 33 00

Dyrekcja Tel.: +48 22 546 22 14
Dyrekcja Fax: +48 22 546 31 90

E-mail: dyrektor@pib-nio.pl NIP: 5250008057
Url: www.pib-nio.pl REGON: 000288366

funkcjonalnych identyfikowanych wariantów DNA. W kolejnych podrozdziałach przedstawiono epidemiologię i metody leczenia glejaków oraz odniesiono się do aktualnych wytycznych w ich klasyfikacji klinicznej, która jest rutynowo wspomagana genetyczno-molekularnymi markerami. W ostatnich podrozdziałach dużo miejsca poświęcono na opisanie bieżącego stanu wiedzy o ocenie markerów w płynnej biopsji, ze szczególnym uwzględnieniem wolnokrążącego DNA (cfDNA) oraz komórek nowotworowych, na tle innych uznanych i badanych rutynowo markerów biochemicznych w chorobie nowotworowej. Ponadto przedstawiono aktualne zaawansowanie prac badawczych oraz przykłady badań klinicznych nad użyciem płynnej biopsji w ocenie jej przydatności w diagnostyce i monitorowaniu leczenia glejaków. Podsumowując, wprowadzenie do tematyki badawczej i zdefiniowanie problemu naukowego zostało przedstawione w sposób wystarczający, objętości poszczególnych podrozdziałów wstępu są odpowiednie, bez zbędnego wybiegania poza zakres pracy.

W pracy zdefiniowano siedem celów, jeden organizacyjny – rekrutacja pacjentów i pobieranie materiału biologicznego, jeden metodyczny – opracowanie metody izolacji i procesowania cfDNA wraz z tworzeniem bibliotek NGS oraz pięć badawczych z użyciem materiału od pacjentów, które spina użycie metody sekwencjonowania DNA.

Rozdział materiały i metody jest napisany bardzo dobrze. Zawiera wystarczające opisy kohort pacjentów dorosłych i pediatrycznych oraz materiału pacjentów używanego do wyprowadzenia hodowli pierwotnych. Szczegółowo przedstawiono sposoby izolacji DNA i cfDNA z materiału biologicznego oraz analizę jego jakości jak również przygotowywania bibliotek i sekwencjonowania. Wystarczająco miejsca poświęcono analizie bioinformatycznej w tym algorytmom filtrującym i annotującym znaczenie funkcjonalne wywołanych wariantów genetycznych.

Prezentację wyników otwiera charakterystyka kliniczna pacjentów dorosłych i pediatrycznych. Kolejne trzy podrozdziały poświęcone są opisowi wyników optymalizacji izolacji DNA z materiału biologicznego, w której najszerzej omówiono testowanie izolacji i jakości DNA z próbek FFPE oraz cfDNA z krwi obwodowej. Do oceny wariantów w cfDNA stworzono panel wyselekcjonowanych 50 genów z większego 664 genowego panelu użytego do oceny wariantów somatycznych i germinalnych w tkankach. **W tej części wyników zabrakło w mojej opinii doświadczenia z weryfikacją limitu detekcji (LOD) wariantu alternatywnego dla tego panelu genowego np. na próbce kontrolnej stworzonej przez zmieszanie prawidłowego genomowego DNA z malejącymi stężeniami cfDNA z nowotworowej linii komórkowej o znanym profilu mutacji somatycznych, uzyskanego przez pocięcie DNA ultradźwiękami. Ponadto proszę w trakcie obrony wyjaśnić czym jest zastosowana w ocenie cfDNA technologia UMI i jakie płyną korzyści z jej użycia.**

W kolejnym rozdziale przedstawiono analizę wariantów somatycznych znalezionych u dorosłych pacjentów. Najczęściej zmutowane geny w tej kohorcie pacjentów odpowiadały tym jakie były wcześniej opisywane dla polskiej populacji. Ciekawym znaleziskiem wśród wariantów

germinalnych jest, wcześniej nieopisana, mutacja typu frameshift w genie AKAP9 (T1334fs) zidentyfikowana u 41 dorosłych pacjentów. W następnym rozdziale przedstawiono, w postaci wykresu waterfall oraz przejrzystej tabeli wyniki oceny wariantów somatycznych w DNA z tkanki nowotworowej i cfDNA, które zidentyfikowano jednocześnie u 8 z 84 przebadanych oboma metodami pacjentów. Ocenę wariantów alternatywnych poszerzono o analizę zmian liczb kopii (CNV), programem ADTE_x, oraz identyfikację somatycznych wariantów pojedynczych nukleotydów (SNV) obecnych tylko w cfDNA, znajdując znane i potencjalnie nowe warianty patogenne. W sumie zastosowanie przez doktorantkę kilku usprawnień metodycznych w izolacji cfDNA (skrócenie czasu procesowania próbek krwi oraz pominięcie fragmentacji DNA) oraz użycie alternatywnego narzędzia bioinformatycznego udowodniło, że ocena cfDNA w glejakach, choć jeszcze daleka od wartości diagnostycznej, może identyfikować warianty somatyczne pochodzące z tkanki nowotworowej. **Średnie pokrycie wariantu alternatywnego dla SNV w cfDNA wyniosło ~1500 reads, jakie wartości pokrycia raportowano w innych pracach z oceną cfDNA w glejakach?**

W kolejnej części rezultatów podjęto próbę oceny wariantów cfDNA w krwi pobranej z żyły szyjnej i powierzchniowej od pacjenta z nawrotowym nowotworem mózgu, wykazując zgodność wariantów w cfDNA uzyskanych z obu lokalizacji z wariantami somatycznymi z tkanki. W następnym podrozdziale zostały z kolei przedstawione rezultaty porównania wariantów somatycznych w hodowlach pierwotnych komórek utrzymywanych w warunkach hipoksji i normoksji, z tymi zidentyfikowanymi w materiale pobranym śródoperacyjnie, w których wykazano, że generalny profil mutacyjny w hodowli pozostaje utrzymany niezależnie od poziomu tlenu zastosowanego w hodowli. Wyniki obu powyższych rozdziałów są istotne, ponieważ pokazują precyzję technologii sekwencjonowania przez wykazanie powtarzalności identyfikacji wariantów somatycznych zarówno w cfDNA jak i w hodowlach tkankowych materiału pierwotnego z glejaków. Ponadto potwierdzenie, że warianty patogenne są utrzymane w hodowli czyni uzyskane modele komórkowe cennym narzędziem do badań przedklinicznych i testowania nowych terapii.

W ostatnim podrozdziale sekcji wyników zaprezentowano rezultaty użycia dużego panelu genowego na archiwalnym materiale pediatrycznych nowotworów mózgu, głównie od pacjentów z gwiazdziakiem włosowatokomórkowym. Analiza wariantów wykazała najczęściej zmutowane geny, w tym KMT2D oraz MTUS2. **Czy brak mutacji somatycznych w typowych genach dla gwiazdziaka takich jak BRAF, FGFR1/2 czy H3F3A wynikał z nieuwzględnienia ich w panelu?** Podsumowując, pomimo, że prezentacja wyników jest wielowątkowa, Doktorantka umiejętnie opisała rezultaty pracy doktorskiej i wykazała, że zamierzone cele zostały zrealizowane.

Dyskusja rozpoczyna się od podkreślenia zgodności profilu i częstości mutacji somatycznych w badanej kohorcie pacjentów z glejakami z tymi obserwowanymi w innych badaniach, w tym z konsorcjum TCGA. Dużo uwagi poświęcono przedyskutowaniu

zidentyfikowanych częstych wariantów germinalnych u pacjentów z glejakiem, w tym w PTEN, MSH5 i AKAP9, wskazując słusznie na ich możliwą asocjację z zapadalnością na te nowotwory. **Czy mutacje germinalne we wskazanych genach były weryfikowane metodą Sanger'a i czy sprawdzono jej obecność w bazie genomów Polaków (<https://1000polishgenomes.com/>)?** Pytanie wynika z zastanawiająco wysokiej częstości wariantu germinalnego w PTEN u pacjentów z glejakiem (97%) przy jednocześnie bardzo niskiej częstości populacyjnej (MAF < 0,00001) tego wariantu. Doktorantka następnie wyczerpująco przedyskutowała generalne ograniczenia oceny wariantów cfDNA w nowotworach, ze szczególnym uwzględnieniem glejaków i jednocześnie, optymistycznie wskazała na ciągłą poprawę jakości tego typu badań poprzez postęp technologiczny w obszarze detekcji wariantów somatycznych w cfDNA oraz ujednolicanie protokołów przedanalizacyjnych np. jak wykazane w dysertacji czas izolacji cfDNA od momentu pobrania krwi. W dalszej części dyskusji zostały omówione dostępne testy diagnostyczne w oparciu o cfDNA, które używane są w diagnostyce i monitorowaniu niektórych nowotworów oraz przytoczono szereg badań klinicznych z udziałem pacjentów z glejakiem, w których użyteczność oceny cfDNA podlega ewaluacji. W kolejnym podrozdziale dyskusji Doktorantka omówiła rezultaty oceny profili mutacyjnych w hodowlach pierwotnych, wskazując słusznie na użyteczność modeli hodowli pierwotnych jako narzędzia do badań przedklinicznych i testowania wrażliwości tkanek pacjentów na leki. **Jednak przytoczony przykład takiego testu, czyli OncoType DX Breast Cancer Assay, nie jest oparty o hodowlę a o sygnaturę ekspresji wybranych transkryptów w tkance pacjentki.** W ostatnim podrozdziale dyskusji Doktorantka skupia się na omówieniu wariantów patogennych zidentyfikowanych w materiale pacjentów pediatrycznych, dogłębnie analizuje ich onkogeną rolę, przywołując również inne nowotwory, oraz wskazuje dla nich potencjalne terapie. Podsumowując, Doktorantka w sposób wyczerpujący przeprowadziła dyskusję uzyskanych wyników na tle dostępnej wiedzy. Jednocześnie na uznanie zasługuje wykazania umiejętności syntetycznego omówienia wielowątkowych rezultatów. W tekście recenzji wyróżniłem potknięcia merytoryczne do wyjaśnienia i pytania pogrubioną czcionką, do których chciałbym aby Doktorantka odniosła się w trakcie obrony

Moja ostateczna ocena rozprawy doktorskiej Pani Pauliny jest pozytywna. Doktorantka posługuje się szerokim wachlarzem technik genomicznych, potrafi analizować, interpretować oraz dyskutować uzyskane wyniki. Mogę zatem uznać Panią Paulinę Szadkowską za doświadczonego biologa molekularnego. Mam nadzieję, że będzie kontynuować z pasją pracę naukową. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630). Zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN o dopuszczenie Pani Pauliny Szadkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego i jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

dr hab. n med. Michał Mikula

NARODOWY INSTYTUT ONKOLOGII IM. MARII SKŁODOWSKIEJ-CURIE – PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY
02-781 WARSZAWA, ul. W.K. ROENTGENA 5,

Warszawa, 29.08.2023



Centrala Tel.: +48 22 546 20 00
Centrala Fax: +48 22 546 33 00

Dyrekcja Tel.: +48 22 546 22 14
Dyrekcja Fax: +48 22 546 31 90

E-mail: dyrektor@pib-nio.pl
Url: www.pib-nio.pl

NIP: 5250008057
REGON: 000288366