



Rec. prz. Grzybowski

Z-ca Przewodniczącej
Rady Dyscypliny Nauki Medyczne

prof. dr hab. Tomasz Grzybowski

Warszawa, 3. 12.2024

Prof. dr hab. Przemysław Juszczynski
Z-ca Dyrektora ds. Nauki
Kierownik Zakładu Hematologii Eksperymentalnej
Instytut Hematologii i Transfuzjologii
Ul. Indiry Gandhi 14
Warszawa 02-776

O C E N A

rozprawy doktorskiej lek. Łukasza Szukalskiego

„ Analiza epigenetycznych modyfikacji DNA w leukocytach i moczu dorosłych pacjentów z ostrą białaczką szpikową (AML) oraz zespołami mielodysplastycznymi ”

Regulacja transkrypcji jest fundamentalnym mechanizmem, który odpowiada za zmiany funkcji/właściwości komórki w procesie różnicowania, transformacji nowotworowej oraz w odpowiedzi na bodźce zewnętrzne (na przykład bodźce mikrośrodowiska, układu immunologicznego lub działanie chemioterapeutyków). W ostatnich latach szczególną uwagę poświęcono zaburzeniom regulacji epigenetycznej w patogenezie nowotworów układu krwiotwórczego i chłonnego. Ten ostatni aspekt wydaje się szczególnie istotny po uzmysłowieniu, iż każda z jądrzastych komórek człowieka zawiera cząstki DNA o łącznej długości 2m, upakowane w jądrze o średnicy ok. 6µm. To upakowanie osiągnięte zostaje przez „nawinięcie” liniowej cząstki DNA na kompleksach białek histonowych. Taka struktura pozwala upakować DNA, którego informacja jest zbędna dla danej komórki w formie heterochromatyny, ale wymaga

precyzyjnej regulacji i oznakowania regionów, które mają być dostępne dla transkrypcji lub wyłączone z tego procesu. Informacja ta jest przekazywana poprzez mechanizmy epigenetyczne, obejmujące kowalencyjne modyfikacje DNA i białek histonowych (metylacja DNA oraz post-translacyjne modyfikacje histonów, w tym metylacje, fosforylacje i acetylacje ogonów histonowych). Modyfikacje epigenetyczne niosą ze sobą informację o gotowości, izolacji i pamięci transkrypcyjnej, zatem jej zaburzenia mogą modyfikować zachowanie komórki. Co więcej, modyfikacje epigenetyczne mogą zmieniać transkryptom komórki bez zmian w pierwszorzędowej sekwencji DNA w odpowiedzi na sygnały mikrośrodowiska i/lub stres środowiskowy. Z uwagi na tak istotny wpływ mechanizmów epigenetycznych na transkrypcję, zrozumiałe jest częste występowanie mutacji w białkach odpowiedzialnych za przekazywanie informacji epigenetycznej. Mutacje dotyczące IDH1/2, DNMT3A, ASXL1 i TET2 należą do najczęstszych w nowotworach układu krwiotwórczego i zwykle pojawiają się wczesnie w procesie onkogenezy (tzn. pojawiają się jako pierwsze w kolejności nabywania mutacji sprawczych), w związku z czym mają charakter klonalny (występują we wszystkich komórkach dominującego klonu). Niektóre z nich (np. DNMT3A, TET2 i ASXL1) są obserwowane także w preleukemicznej hematopoezie klonalnej (CHIP), co wskazuje, iż zapewniają komórce klonalną „korzyść” i stanowią wydarzenie inicjujące leukemogenezę.

Rozprawa lek. Łukasza Szukalskiego dotyczy tych właśnie aspektów biologii komórek AML i MDS. W swoich badaniach doktorant postanowił ocenić procesy epigenetyczne u dorosłych chorych z AML i MDS.

Rozprawa przedstawiona mi do oceny posiada konstrukcję typową dla rozpraw doktorskich i obejmuje wstęp, przedstawienie celów i zakresu pracy, opis materiałów i metod, wyniki, dyskusję oraz wnioski. Rozprawę uzupełniają streszczenie w języku polskim i angielskim, spis użytych skrótów, kopia zgody komisji bioetycznej oraz 175 pozycji piśmiennictwa (wśród których dominują prace starsze, a nowsze, opublikowane po 2020 roku są w zdecydowanej mniejszości).

We wstępie pracy, szczególną uwagę Autor poświęca definicji i klasyfikacji AML i MDS, aspektom kliniczno-terapeutycznym tych chorób oraz molekularnym mechanizmom epigenetycznym, skupiając się na metylacji DNA. Ta część pracy wskazuje na głęboką

wiedzę Autora, choć Doktorant nie uniknął kilku błędów. Po pierwsze – na stronie 10 pisze, iż mutacje genów zaangażowanych w procesy epigenetyczne nie znalazły się w aktualnej stratyfikacji ryzyka wg ELN, podczas gdy w tabeli stronę wcześniej, zgodnie z prawdą, zamieszczył w klasie wysokiego ryzyka geny ASXL1 i EZH2. Autor omawia następnie zjawiska epigenetyczne i udział genów odpowiadających za te modyfikacje w patogenezie chorób nowotworowych układu krwiotwórczego. Brakuje w tej części pracy jednak szerszej definicji modyfikacji epigenetycznych wykraczającej poza metylację DNA. Największym jednak brakiem tej części pracy jest kompletne pominięcie patogenezы hematopoezy klonalnej (CHIP – Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential), jako zespołu mogącego poprzedzać nowotwory układu krwiotwórczego. Jest to w mojej opinii dość duże zaniedbanie, ponieważ u podstawy CHIP leżą mutacje genów – modulatorów epigenetycznych, w tym DNMT3A, TET2 i ASXL1. Oczekiwałbym rozwinięcia tego tematu podczas obrony pracy, z omówieniem roli tych mutacji w promowaniu zapalenia i klonalnej przewagi linii mieloidalnej („myeloid bias”). Następnie Autor przedstawia szczegółowe cele badań, które definiuje następująco:

1. Analiza poziomów produktów aktywnej demetylacji w DNA leukocytarnym krwi obwodowej dorosłych pacjentów z AML i MDS oraz grupy kontrolnej
2. Analiza stężeń produktów aktywnej demetylacji w moczu pacjentów dorosłych z AML i MDS oraz grupy kontrolnej celem oceny zaangażowania mechanizmów naprawczych modyfikacji epigenetycznych w tych grupach pacjentów
3. Analiza ekspresji mRNA genów zaangażowanych w procesy epigenetyczne w grupie pacjentów z AML i MDS oraz w grupie kontrolnej i ich wpływ na szlak TET-TDG-BER aktywnej demetylacji DNA
4. Ocena częstości występowania mutacji genów zaangażowanych w procesy epigenetyczne u pacjentów dorosłych z AML i MDS
5. Ocena wpływu wyjściowych poziomów produktów demetylacji w DNA leukocytarnym oraz stężeń tych produktów w moczu na dane kliniczne: ryzyko transformacji MDS do AML, odpowiedź na chemioterapię indukującą oraz długość życia pacjentów z AML.

Autor w badaniach skupia się na bezpośredniej ocenie metylowanej cytozyny (5-mC) i jej metabolitów: 5-hydroksymetylocytozyny, 5-formylocytozyny, 5-karboksy cytozyny,

5-hydroksymetylouracylu, wykorzystując do tego celu chromatografię cieczową połączoną ze spektrometrią mas.

Materiałem do badań były leukocyty krwi obwodowej i mocz pacjentów. **Tu pojawia się najważniejsza uwaga dotycząca metodyki badania, która w mojej ocenie może istotnie podważać lub zmieniać wnioski płynące z badań:** autor nie izolował blastów z krwi obwodowej, badał natomiast całą frakcję mononuklearów. Ponieważ grupie na pewno byli pacjenci z blastami na obwodzie, jak i z cytopeniami, tak heterogenny materiał nie może być podstawą do wyciągania poprawnych z biologiczno- patogenetycznego i molekularnego punktu widzenia wniosków. Brakuje nawet tabeli, w której zestawiono by dane dotyczące leukocytozy i odsetka blastów obwodowych. Z tego samego powodu – ocena ekspresji genów, które oceniał autor nie odnosi się wyłącznie do komórek nowotworowych, a wnioskowanie sugeruje, że tak właśnie jest.

Musze ponadto zwrócić uwagę na kompletny chaos w nazewnictwie, który trudno zaakceptować, bo wskazuje na braki w elementarnej wiedzy biochemicznej lub zwykłe roztargnienie. Autor pisze wielokrotnie o oznaczaniu „deoksycytozyny” w hydrolizacie DNA leukocytów lub w moczu. Cytozyna jest pirymidyną, która tworząc wiązanie glikozydowe z rybozą lub deoksyrzybozą, tworzy cytydynę lub deoksycytydynę. Deoksycytydyna podlega metylacji, tworząc 5-m-deoksycytydynę, która może podlegać utlenianiu, tworząc 5-hydroksymetylocytydynę, i następnie 5-formylmetylocytydynę/5-karboksycytydynę, z których sama pirymidyna może zostać „wycięta” przez glikozylazę TDG, uwalniając modyfikowaną zasadę. Nie jest mi znany związek pod nazwą „deoksycytozyna”. I nie jest to jednorazowa pomyłka, a notorycznie powtarzany błąd. Domyślam się, że autorowi chodziło o znaczenia 5-metylodeoksycytydyny i jej metabolitów w hydrolizatach DNA, a w moczu – wolnej zarówno deoksycytydyny i jej metylowanych pochodnych i ich metabolitów, jak i wolnej zasady (cytozyny) i jej pochodnych. Niemniej jednak, ten chaos jest istotnym zarzutem pod adresem doktoranta.

W sekcji „Wyniki” Autor podsumowuje wykonane oznaczenia – z których, w znacznej części, przez wskazany powyżej chaos nomenklatury – trzeba mocno domyślać się, co miał na myśli.

Do tej części mam następujące pytania i uwagi:

1. Część porównań w mojej ocenie jest prowadzona nieco przypadkowo i trudna do merytorycznego uzasadnienia. Jaka hipoteza na przykład stoi za poszukiwaniem zależności między zawartością metylowanej deoksycytydyny w leukocytach krwi obwodowej (był to materiał do badań) a liczbą blastów w szpiku? Poprawniejszą analizą byłoby odniesienie zawartości metylowanej deoksycytydyny w leukocytach krwi obwodowej do liczby blastów w krwi obwodowej. Czy Autor może taką analizę wykonać?
2. Z jakiego powodu Autor nie wykonał badań stanu mutacji DNMT3A i innych genów wpływających na metylację DNA (ASXL1)?
3. Brakuje mi w pracy wyników analiz metylocytozyny i jej metabolitów w moczu w zależności od stanu mutacji genów TET1, IDH1/2 (i DNMT3A/ASXL1, ale tych oznaczeń w ogóle nie wykonano). Czy Autor obserwował różnice w ilości wydalanych z moczem badanych związków między grupami chorych różniącymi się mutacjami w TET2/IDH1/2?
4. Obserwacje dotyczące zależności między stężeniem 5mC i jej metabolitów w moczu a czasem przeżycia są interesujące i warte rozwinięcia. W krytycznej interpretacji tych wyników Autor skupił się jednak tylko na niektórych hipotezach mogących tłumaczyć ten efekt. W moim przekonaniu, stężenie 5mC może po prostu odzwierciedlać całkowitą masę guza, mogą też zależeć od stanu mutacji – czego autor nie przedstawił. Dobrze byłoby, gdyby Autor zechciał uzupełnić te analizy.

Wnioski płynące z pracy Doktorant przedstawia następująco:

1. Wykazano obniżenie poziomu 5-hmdC W DNA leukocytarnym pacjentów z AML względem grupy kontrolnej oraz pacjentów z MDS względem grupy kontrolnej;
2. Stwierdzono różnice w stężeniach produktów aktywnej demetylacji w moczu: najwyższe stężenia pacjentów z AML, pośrednie u pacjentów z MDS oraz najniższe w grupie kontrolnej. Wykazano przez to różnice w nasileniu zaburzeń epigenomu w tych grupach: największe wśród pacjentów z AML, pośrednie wśród pacjentów z MDS oraz najniższe w grupie osób zdrowych;

3. Wykazano zwiększoną ekspresję mRNA TET1 oraz TET3 w grupie pacjentów z AML względem grupy kontrolnej, co przy stwierdzonym jednocześnie spadku ekspresji TET2 wspiera hipotezę zakładającą kompensacyjną funkcję genów TET1 oraz TET3 w odpowiedzi na deplecję TET2. Dodatkowo w grupie pacjentów z AML wykazano znacznie wyższą ekspresję mRNA genu TDG w stosunku do osób zdrowych, co odzwierciedla znaczne nasilenie procesów naprawczych zaburzeń metylacji przez TET-TDG- BER-zależną aktywną demetylację DNA w grupie chorych na AML.
4. Określono częstość występowania mutacji w genach TET2, IDH1 oraz IDH2 w populacji pacjentów z AML oraz MDS, zbieżną z danymi literaturowymi.
5. Wykazano, że poziomy produktów aktywnej demetylacji w DNA leukocytarnym oraz stężenia tych produktów w moczu pacjentów z AML nie mają wpływu na odpowiedź na leczenie chemioterapią intensywną. Pacjenci z MDS, u których doszło do transformacji do AML mieli niższy wyjściowy poziom 5-mdC w DNA leukocytarnym niż pacjenci, u których nie doszło do transformacji. Wykazano, że pacjenci z AML z niskim wyjściowym stężeniem 5-mdC w moczu mieli dłuższe przeżycie całkowite, niż pacjenci z wysokim stężeniem 5-mdC

W związku z wątpliwościami dotyczącymi ocen metabolitów deoksycydy w DNA leukocytarnym, wnioski z tych analiz należy traktować z ostrożnością. Natomiast oznaczenia tych związków w moczu mogą odzwierciedlać aktywność procesów demetylacji/metylacji i masę guza, w związku z czym – mogą mieć rzeczywiste znaczenie w monitorowaniu choroby jako marker.

Rozprawę kończy dyskusja, w której Autor konfrontuje swoje wyniki z danymi innych autorów. Nadinterpretacją jest natomiast używanie pojęcia „epigenom” w odniesieniu do uzyskanych przez doktoranta wyników. Epigenom obejmuje bowiem panel innych modyfikacji, nie tylko metylację DNA.

Za dużą wartość uważam krytyczne odniesienie się do własnych wyników w sekcji dotyczącej ograniczeń przeprowadzonych badań i zastosowanej metodyki.

W dyskusji Autor sugeruje, że nieselektywne leki demetylujące powinny zostać wyparte przez leki demetylujące określone obszary genomu. Czy Autor byłby w stanie zaproponować taka selektywną strategię?

Reasumując, pomimo sformułowanych powyżej uwag, które powinny stanowić przyczynę do dyskusji z Doktorantem w trakcie obrony, uważam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa stanowi oryginalne opracowanie naukowe i spełnia ustawowe wymogi stawiane rozprawom doktorskim.

Pragnę przeto przedstawić Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy wniosek o dopuszczenie lek. Łukasza Szukalskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

2 powasowane,
+ J. J. J. J. J.

