



# Katedra i Klinika Hematologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

**Kierownik: Prof. dr hab. med. Grzegorz W. Basak**

**ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa**

Tel. 022-599-28-18; fax: 022-599-14-18; e-mail: hematologia@wum.edu.pl

Warszawa, 19.06.2022

Prof. dr hab. n. med. Krzysztof Jamroziak

Klinika Hematologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

## **Recenzja osiągnięcia naukowego i aktywności naukowej dr inż. Patryka Krzezińskiego**

Dr inż. Patryk Krzeziński jest absolwentem jednolitych studiów magisterskich Międzywydziałowego Studium Biotechnologii, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. W 2008 r., na podstawie rozprawy: "Występowanie i aktywność wybranych receptorów nukleotydowych w nowotworowych liniach komórkowych pochodzenia glejowego", uzyskał tytuł doktora nauk biologicznych w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego Polskiej Akademii Nauk. Po obronie doktoratu dr inż. Krzeziński przez rok pracował w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego w zespole profesora Krzysztofa Zabłockiego. Następnie, w latach 2009 - 2020, odbył staż podoktorski w Salamance w Hiszpanii, gdzie zajmował się badaniami nad patogenezą molekularną szpiczaka plazmocytozy. Badania te były prowadzone początkowo w Centrum Badań nad Rakiem w Salamance (Cancer Research Center, Salamanca, Spain), a następnie we współpracy z Wydziałem Hematologii Szpitala Uniwersyteckiego w Salamance (University Hospital of Salamanca, Spain). W obu przypadkach badania były prowadzone w ramach renomowanego zespołu kierowanego przez profesora Jesúa San Miguela. Podczas pobytu w Hiszpanii dr inż. Krzeziński ukończył również kursy dotyczące zarządzania zespołem, metod metaanalizy statystycznej oraz standardów Dobrej Praktyki Klinicznej. Od 2020 r. pracuje na stanowisku adiunkta w Katedrze Nanobiotechnologii, Instytutu Biologii, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

## Ocena osiągnięcia naukowego pt. „Wpływ wybranych zmian genetycznych i epigenetycznych na patogenezę szpiczaka plazmocytozy”

Na osiągnięcie naukowe dr inż. Patryka Krzezińskiego składa się cykl 5 prac opublikowanych w latach 2015-2020, w tym cztery artykuły eksperymentalne i jedna praca przeglądowa. Łączny wskaźnik wpływu (IF) dla w/w cyklu prac wynosi 23.81, a całkowita liczba punktów MNiSW na rok publikacji 240.

Szpiczak plazmocytozy (ang. Myeloma Multiple, MM) jest rozrostem klonalnym wywodzącym się z komórki plazmatycznej i należy do najczęstszych nowotworów hematologicznych człowieka. Znaczny postęp, jaki dokonał się w ostatnich dekadach w rozumieniu patobiologii MM, a także wprowadzenie do terapii wielu nowych leków, spowodowały znaczną poprawę rokowania MM. Jednak, pomimo istotnego wydłużenia czasu życia chorych, u większości z nich nie udaje się uzyskać wyleczenia. Fakt ten jest tłumaczony jest m.in. złożonością i heterogennością zaburzeń genetycznych u poszczególnych pacjentów z MM, co prowadzi do selekcji klonów komórek opornych podczas chemioterapii.

U chorych na MM stwierdza się występowanie wielu zaburzeń genetycznych, głównie na poziomie struktury i liczby chromosomów, ale także mutacji punktowych. Uzasadnia to potrzebę prowadzenia badań podstawowych, które mogłyby doprowadzić do identyfikacji nowych celów terapeutycznych i rozwoju optymalnych metod diagnostycznych. Do obiecujących kierunków badawczych w tym zakresie należą epigenetyczne (np. metylacja DNA) oraz związane z mikroRNA mechanizmy regulacji ekspresji genów zidentyfikowanych jako istotne w biologii MM.

W pracy przeglądowej pt. „Factors regulating microRNA expression and function in multiple myeloma” dr inż. Krzeziński opisał mechanizmy regulacji ekspresji mikroRNA oraz przedstawił dane przemawiające za powiązaniem pomiędzy modyfikacjami epigenetycznymi, lekoopornością i apoptozą w komórkach MM. Zgodnie z opinią Autora pracy, z którą niewątpliwie należy się zgodzić, stanowi to uzasadnienie dla prowadzenia badań łączących informacje epigenetyczne z genetycznymi w celu lepszego poznania choroby i sprawniejszego diagnozowania. Stan wiedzy przedstawiony w powyższej publikacji umożliwił postawienie hipotezy badawczej, według której modyfikacje epigenetyczne wraz ze zmianami genetycznymi wpływają na rozwój MM.

W publikacji oryginalnej „Insights into epigenetic regulation of microRNA-155 expression in multiple myeloma.” dr inż. Krzeziński zbadał mechanizmy wpływające na ekspresję mikroRNA155, w tym przede wszystkim potencjalną rolę metylacji DNA. Początkowo autor ocenił ekspresję mikroRNA155 w 11 liniach komórkowych MM o szerokim wachlarzu aberracji genetycznych wykazując brak korelacji między translokacjami chromosomowymi, a wysokim poziom ekspresji tego mikroRNA. Jednocześnie, w celu potwierdzenia wcześniejszych danych zmierzył poziom ekspresji mikroRNA155 w próbkach wyizolowanych od ponad 90 pacjentów chorych na MM stwierdzając u większości niską ekspresję. Następnie Autor wykazał, porównując odpowiednie próbki materiału biologicznego, że u większości pacjentów po zdiagnozowaniu nawrotu dochodzi do obniżenia ekspresji mikroRNA155. Wyniki





analizy przeżycia pokazały, że wyższy poziom mikroRNA155 jest dobrym czynnikiem prognostycznym łączącym się z dłuższym czasem całkowitego przeżycia. Otrzymane wyniki badań były punktem wyjścia do poszukiwania mechanizmów mogących regulować ekspresję mikroRNA155 w komórkach MM. Przeprowadzone doświadczenia pozwoliły zademonstrować wzajemne oddziaływania różnych mechanizmów epigenetycznych w regulacji poziomu ekspresji mikroRNA155. Za pomocą oznaczenia metylacji DNA promotora genu kodującego mikroRNA155 w próbkach uzyskanych od chorych na MM wykryto udział metylacji DNA w regulacji ekspresji mikroRNA155. Dr inż. Krzemiński wykazał również, że farmakologiczne hamowanie metylacji za pomocą decytabiny może podnieść poziom ekspresji mikroRNA155. Następnie, za pomocą eksperymentów porównujących wartości luminescencji komórek transfekowanymi zmetylowanym i niezmetylowanym konstruktem powstałym z fragmentu promotora genu gospodarza mikroRNA155 i wektora plazmidowego kodującego gen reporterowi lucyferazy Autor potwierdził udział metylacji w regulacji ekspresji mikroRNA155 w komórkach MM. Dalszym potwierdzeniem epigenetycznego mechanizmu regulacji ekspresji mikroRNA155 było spowodowanie metylacji w obrębie genu gospodarza mikroRNA155 bezpośrednio w komórkach MM linii JN3, wykorzystując mechanizm RNA zależnej metylacji DNA - RDDM (ang. RNA directed DNA methylation). Dodatkowo, dr inż. Krzemiński przeprowadził doświadczenia EMSA (ang. Electrophoretic Mobility Shift Assay), którego wyniki dostarczyły danych wskazujących na regulację sekwencji E-Box przez metylację DNA. Na kolejnym etapie badań Autor dokonał stymulacji wybranych linii komórek szpiczaka, endotoksyną lipopolisacharydem bakteryjnym- (ang. Lipopolisacharide, LPS).

Najważniejszym, wynikiem przeprowadzonych badań było zaobserwowanie możliwości zmiany metylacji DNA za pomocą odpowiednio zaprojektowanych sekwencji RNA wykorzystując mechanizm (ang. RDDMRNA directed DNA methylation). Przeprowadzone badania pokazały również, że metylacja DNA genów kodujących mikroRNA jest trwałym mechanizmem wyciszania ekspresji i może być rozważana jako potencjalny wskaźnik prognostyczny.

W badaniach opisanych w pracy oryginalnej "Integrative analysis of DNA copy number, DNA methylation and gene expression in multiple myeloma reveals alterations related to relapse" dr inż. Krzemiński przeanalizował zależności między zmianami genetycznymi, ekspresją genów i metylacją DNA na dwóch etapach rozwoju MM, tj. w momencie rozpoznania oraz pierwszego nawrotu choroby. Na podstawie zebranych informacji klinicznych oraz bazy danych biobanku uniwersyteckiego szpitala klinicznego w Salamance Autor zidentyfikował grupę sparowanych próbek materiału biologicznego od 20 pacjentów z MM wyizolowanych w momencie diagnozy szpiczaka oraz pierwszej wznowy choroby. W tym materiale zbadano używając trzech różnych typów mikromacierzy profil ekspresji genów, profil metylacji DNA i profil zmian genetycznych. Najważniejszym wynikiem przeprowadzonego badania było zaobserwowanie korelacji między metylacją DNA a ekspresją dla dwóch genów GLTD1 i SORL1. Biorąc pod uwagę różnice w charakterystyce badanych pacjentów (różne translokacje, wiek, płeć, schemat terapii i czas do wznowy), wykryte geny mogą wskazywać na nowe, nieznanne w szpiczaku szlaki sygnałowe istotne z punktu widzenia badania progresji choroby.





W pracy „Zebularine-induced myeloma cell death is accompanied by decreased c-Myc expression” celem badań dr inż. Krzemińskiego było sprawdzenie wpływu zebularyny na żywotność komórek MM oraz próba zdefiniowania kluczowych mechanizmów molekularnych działania tego związku w komórkach MM. Zebularyna to czynnik hipometylujący drugiej generacji, który hamuje metylację DNA, a dodatkowo hamuje również aktywność deaminazy cytydyny (ang. Cytidine deaminase - CDA), enzymu odpowiedzialnego za oporność komórek nowotworowych na leki będące analogami nukleozydów. Najważniejszym wynikiem przeprowadzonych badań było zaobserwowanie efektu cytotoksycznego zebularyny pomimo braku indukcji uszkodzeń DNA w szpiczakowych liniach komórkowy MM1s i KMS12PE. Ten wynik w odniesieniu do pozostałych wskazuje na wielotorowe działanie badanego związku wykraczające poza hamowanie metylacji i powodowanie uszkodzeń DNA. Otrzymane wyniki mogą stanowić podstawę badań mających na celu opracowanie nowych strategii terapeutycznych MM wykorzystujących modyfikację metylacji DNA.

Celem badań opisanych w pracy “Quantitative expression of Ikaros, IRF4, and PSMD10 proteins predicts survival in VRD treated patients with multiple myeloma” była identyfikacja nowych białkowych biomarkerów rozwoju MM niezależnych od zmian genetycznych. Autor przeprowadził badania za pomocą innowacyjnej metody CNIA (ang. capillary nanoimmunoassay), która pozwala na analizę kilkudziesięciu białek w jednej próbce. W przeprowadzonych badaniach określono ilościowo poziom białek regulujących działanie leków przeciwszpiczakowych w 174 próbkach od chorych na MM. Wykazano, że pacjenci z wysokim poziomem białek Ikaros, Aiolos, PSMD1, PSMD4, PSMD10 i niskim poziomem Cereblon i IRF4 charakteryzowali się krótszym czasem przeżycia. W ramach tych badań dr inż. Krzemiński zaproponował ocenę ilości białek biorących udział w mechanizmie działania gluokortykoidów, które są jednymi z kluczowych leków w terapii MM. Wykonano oznaczenia dwóch białek - receptora dla gluokortykoidów (GCR) i białka XPO1 z rodziny eksportyn. Najważniejszym wynikiem tej pracy badania było wykrycie potencjalnego biomarkera związanego z działaniem glukokortykoidów, którym może być stosunek ilości GCR i XPO1 (białka transportujące GCR) z uwagi na zaobserwowany związek tej wartości z czasem przeżycia wolnego od progresji MM.

### **Ocena działalności naukowej**

O dużej aktywności naukowej dr inż. Patryka Krzemińskiego świadczy dorobek publikacyjny o sumarycznym czynniku wpływu IF 77,38, oraz liczba cytowani 271 i wskaźnik Hirsha 11. Dr inż. Patryk Krzemiński po obronie doktoratu przez rok pracował w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M Nenckiego w Warszawie w zespole profesora Krzysztofa Zabłockiego, w którym brał udział w badaniach związanych z pomiarem poziomu jonów wapnia oraz optymalizacją elektroforezy 2D. Następnie wyjechał na staż podoktorski do Salamanki (Hiszpania), gdzie miał możliwość zdobywać doświadczenia naukowe w najlepszych laboratoriach zajmujących się badaniami nad MM, początkowo w Centrum Badań nad Rakiem w Salamance (Cancer Research Center, Salamanca, Spain), następnie w ramach współpracy z Wydziałem Hematologii Szpitala Uniwersyteckiego w Salamance (University Hospital of





Salamanca, Spain). Praca w tych ośrodkach naukowych umożliwiła mu praktyczne zapoznanie z najnowszymi technikami biologii molekularnej we współpracy z zespołem naukowców i lekarzy kierowanych przez prof. Jesúa San Miguela, jednego z kluczowych ekspertów klinicznych i naukowych w dziedzinie MM. Należy podkreślić, że ten ośrodek w dziedzinie badań nad MM należy do wiodących na świecie.

Poza cyklem prac będących podstawą habilitacji, dr inż. Patryk Krzemiński prowadził również badania nad rolą metylacji DNA w regulacji ekspresji mikroRNA214 i Cykliny D2. Stwierdzono, że zastosowanie inhibitora metylacji DNA powodowało wzrost ekspresji mikroRNA214, co wskazuje na możliwość epigenetycznej regulacji ekspresji tego mikroRNA. W kolejnym projekcie dr inż. Krzemiński badał przyczyny nasilonej ekspresji Cykliny D2 w MM. Zaobserwowano, że wyspa CpG w regionie regulatorowym genu Cykliny D2 była silniemetylowana tylko w liniach komórkowych MM z t(11:14), co sugeruje udział tej modyfikacji epigenetycznej w regulacji ekspresji. Efektem tej współpracy były dwie publikacje (Misiewicz-Krzeminska et al., 2013, 2016). Oprócz badań związanych z metylacją DNA dr inż. Patryk Krzemiński brał udział w projektach mających na celu lepsze poznanie roli białka SDC1 (CD138) w komórkach MM. Wyniki doświadczeń opisano w pracy (Paíno et al., 2014).

Kolejnym projektem, w który brał udział dr inż. Patryk Krzemiński było badanie wariantu receptora androgenowego ARV7 w komórkach raka prostaty. Efektem tej współpracy była publikacja (García et al., 2017)

Tematyka badań związanych z MM pozostawała w obszarze głównych zainteresowań naukowych dr inż. Patryka Krzemińskiego, co wiąże się, między innymi, z kontynuacją badań mających na celu wyjaśnienie molekularnych mechanizmów działania nowego inhibitora białka c-Myc. Udział w tym projekcie zaowocował szeregiem doniesień konferencyjnych oraz zgłoszeniem patentowym: WO2019048679.

Po powrocie do Polski dr inż. Patryka Krzemiński nawiązał współpracę naukową z Dr. Sarą Lopez-Gomollon, pracującą w RNA Silencing and Disease Resistance Group, Department of Plant Sciences, University of Cambridge w Wielkiej Brytanii. Celem wspólnych badań jest opracowanie sondy typu BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) pozwalającej na pomiar i monitorowanie metylacji DNA.

### **Ocena działalności dydaktycznej, organizacyjnej i popularyzatorskiej**

Dr inż. Patryka Krzemiński ma bogate doświadczenie w zakresie działalności dydaktycznej. Przed wyjazdem na staż podoktorski prowadził zajęcia z biochemii dla studentów Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Będąc na stażu podoktorskim w Hiszpanii zdobyłą wiedzę z zakresu epigenetyki upowszechniał poprzez prowadzenie zajęć w ramach studiów podyplomowych organizowanych przez Centrum Badań nad Rakiem w Salamance. Po powrocie do Polski w 2020r. dr inż. Krzemiński podjął prace na stanowisku Adiunkta w Katedrze Nanobiotechnologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, gdzie prowadzi zajęcia dla studentów między innymi z zakresu biologii komórki nowotworowej i macierzystej, metabolomiki, kancerogenezy i cytofizjologii. I



Istotną część dotychczasowej działalności dydaktycznej dr inż. Patryka Krzemińskiego stanowiła opieka nad rozwojem naukowym młodych badaczy. W trakcie stażu podoktorskiego w Hiszpanii był on opiekunem naukowym dwóch doktorantów tamtejszego uniwersytetu, a także sprawował opiekę naukową nad doktorantką z Instytutu Biologii Doświadczalnej im M Nenckiego, która odbywała staż naukowy w laboratorium w Centrum Badań nad Rakiem w Salamance (Centro de Investigación del Cáncer Salamanca) w ramach programu Erasmus plus Ponadto, dr inż. Patryka Krzemiński pełnił rolę promotora pomocniczego pracy doktorskiej mgr Wiktorii Frączek pt. „Wpływ nanocząstek diamentu na szlak kinaz tyrozynowych w glejaku wielopostaciowym”, której promotorem jest dr hab. Marta Grodzik prof. SGGW, Instytut Biologii, SGGW

Dr inż. Patryka Krzemiński ma również osiągnięcia na polu działalności organizacyjnej. W latach 2006-2007 brał udział w organizacji Tygodnia Nauki odbywającego się w ramach Festiwalu Nauki. W 2009 r współuczestniczył w organizacji laboratorium Hematologii w Centrum Badań nad Rakiem w Salamance. Natomiast, w 2012r brał udział w organizacji Krajowego Kongresu Hiszpańskiego Towarzystwa Hematologii i Hemoterapii (LIV Reunión Nacional SEHH / XXVIII Congreso SETH -Salamanca 18-20, Octubre 2012).

W ocenie roli popularyzującej naukę w działalności dr inż. Patryka Krzemińskiego należy wyróżnić udział w dwóch edycjach Festiwalu Nauki (2006-2007) oraz współredagowanie w latach 2007-2008 wewnętrznego, popularnonaukowego biuletynu Instytutu im. M. Nenckiego o nazwie BRAINs, w którym były zamieszczone najważniejsze doniesienia naukowe z obszaru neurobiologii i bieżące informacje z życia naukowego jednostki.

### **Podsumowanie i wnioski**

Przedstawione mi do oceny osiągnięcia naukowe dr inż. Patryka Krzemińskiego spełniają kryteria określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku, Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U, z 2018 r, poz. 1668 ze zm.) stawiane kandydatom do stopnia doktora habilitowanego.

Oceniany cykl publikacji jest spójnym i istotnym wkładem intelektualnym poszerzającym naszą wiedzę na temat roli zmian genetycznych i epigenetycznych w biologii szpiczaka plazmocytoowego, w tym, w szczególności, w procesach prowadzących do nawrotu choroby i nabywania oporności na leki. Badania nad epigenetycznymi mechanizmami regulacji ekspresji mikroRNA155 wykazały wartość prognostyczną oraz konsekwencje wyciszenia ekspresji tego mikroRNA na drodze metylacji DNA. W kolejnej pracy scharakteryzowano częściowo wpływ zmian genetycznych i epigenetycznych na ekspresję genów w procesie nawrotu szpiczaka. Ponadto, przeprowadzono doświadczenia, w których wyjaśniono wielotorowy mechanizm działania mało znanego inhibitora metylacji DNA – zebularyny. Wyniki eksperymentów oceniających jednocześnie ilość wielu białek w komórkach chorych na szpiczaka plazmocytoowego wskazały nie tylko na prognostyczną funkcję określonych części składowych proteasomu, ale również udowodniły, że stosunek ilości poszczególnych białek

może mieć znaczenie prognostyczne. Uzupełnieniem cyklu publikacji była praca przeglądowa systematyzująca informacje na temat znaczenia zmian genetycznych i epigenetycznych w regulacji ekspresji mikroRNA w szpiczaku plazmocytowym. W mojej opinii wyniki przedstawionych do oceny prac nie tylko dostarczają nowych informacji na temat biologii szpiczaka plazmocytoowego, ale mogą przyczynić się do opracowania lepszych metod prognostycznych i skuteczniejszych terapii tego wciąż nieuleczalnego nowotworu.

Jako recenzent komisji habilitacyjnej popieram wniosek Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego dr inż. Patryka Krzemińskiego i wnoszę o nadanie wyżej wymienionemu stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie Nauki Biologiczne.



