



prof. dr hab. Izabela Makałowska
Instytut Biologii i Ewolucji Człowieka
Wydział Biologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
w Poznaniu

Poznań, 25.11.2021

Ocena osiągnięć dr Tomasza Stokowego

w związku z postępowaniem o nadanie stopnia doktora habilitowanego
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne.

Ocena osiągnięcia naukowego

Na osiągnięcie naukowe habilitanta, zatytułowane „Precyzyjna identyfikacja rzadkich wariantów genetycznych w danych pochodzących z sekwencjonowania DNA wysokiej przepustowości”, składa się cykl pięciu wieloautorskich prac opublikowanych w latach 2016-2019. Wszystkie prace ukazały się w renomowanych czasopismach znajdujących się na liście JCR. Sumaryczna punktacja IF czasopism, w których ukazały się publikacje wynosi 27,841. Prace stanowiące osiągnięcie habilitacyjne są oryginalnymi pracami badawczymi, a doktor Stokowy jest pierwszym autorem dwóch z nich. W jednej pracy jest autorem ostatnim, a w pozostałych drugim i siódmym. Jak wynika z załączonych oświadczeń współautorów, udział doktora Stokowego w powstaniu każdej z publikacji był znaczący. Zgodnie z Ustawą o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki, osiągnięcie naukowe może stanowić cykl publikacji powiązanych tematycznie. Oceniany cykl jak i pozostałe materiały spełniają w mojej opinii wszystkie wymagane ustawowo kryteria.

Celem badawczym jaki postawił sobie habilitant było stworzenie metod i narzędzi bioinformatycznych służących do analizy sekwencji genomowych i ich wykorzystanie do identyfikacji wariantów DNA będących przyczyną chorób o podłożu genetycznym. Analizy danych WGS (z ang. Whole Genome Sequencing) wykonywane są od wielu lat i zaczynają być standardowym elementem diagnostyki. Pomimo tego stanowią one ciągle spore wyzwanie. Złożoność analizowanych danych i nasza niewystarczająca wiedza na temat zmienności, wariantów i chorób genetycznych niewątpliwie przyczyniają się do tych trudności. Cel jaki wyznaczył sobie habilitant był nie tylko ważny z punktu widzenia czysto naukowego, ale i istotny dla diagnostyki chorób rzadkich.

Pierwsza z prac stanowiących osiągnięcie habilitacyjne opublikowana została w czasopiśmie

naukowym *Bioinformatics*. Habilitant jest pierwszym z 12 autorów. Publikacja dotyczy narzędzia bioinformatycznego RareVariantVis, które dr Stokowy stworzył na potrzeby analizy danych WGS. Narzędzie to służy do filtrowania, adnotacji i wizualizacji rzadkich wariantów genetycznych i regionów utraty heterozygotyczności. Niewątpliwą zaletą stworzonego przez habilitanta narzędzia jest bardzo przejrzysta wizualizacja oraz możliwość przedstawiania danych zarówno dla pojedynczego genomu jak i dla tzw. *trios* lub też większej liczby genomów. Narzędzie RareVariantsVis może być także wykorzystane do identyfikacji wariantów somatycznych co jest niezwykle istotne w przypadku genomów nowotworowych. Podkreślić należy, że narzędzie współpracuje ze standardowo wykorzystywanym oprogramowaniem do identyfikacji wariantów genetycznych takich jak GATK czy DeepVariant.

Naturalnym kolejnym krokiem badawczym było wykorzystanie stworzonego narzędzia w analizach mających na celu identyfikację sprawczych wariantów stanowiących podłoże rzadkich chorób genetycznych. Kolejna praca będąca częścią osiągnięcia habilitacyjnego prezentuje wyniki takich właśnie analiz i dotyczy keratolicznego rumienia zimowego, choroby charakteryzującej się sezonowym łuszczeniem się skóry. Analiza danych WGS przeprowadzona z wykorzystaniem stworzonego przez dra Stokowego oprogramowania pozwoliła na identyfikację duplikacji wzmacniacza w rejonie genu *CTSB*. Umożliwiło to nie tylko określenie genetycznego podłoża choroby, ale także dalsze badania funkcjonalne, które doprowadziły do lepszego zrozumienia funkcji genu *CTSB*. Praca została opublikowana w wysokiej rangi czasopiśmie *The American Journal of Human Genetics*. Dr Stokowy jest siódmym z 29 autorów. Pomimo tego, że habilitant nie jest wiodącym autorem publikacji, jego wkład w otrzymane wyniki był bez wątpienia znaczący. Identyfikacja wariantu wykazującego asocjację z chorobą była kluczowym krokiem umożliwiającym zarówno rozpoczęcie diagnostyki choroby jak i dalsze badania funkcjonalne związane z genetycznymi chorobami skóry. Podkreślić należy także, że identyfikacja sprawczych wariantów znajdujących się poza rejonem kodującym genu jest znacznie trudniejszym zadaniem niż w przypadku wariantów związanych ze zmianami w sekwencji kodującej, a szczególnie jeśli wariantem tym jest tandemowa duplikacja.

Trzecia praca została opublikowana w czasopiśmie *Scientific Reports*. Habilitant jest ostatnim i korespondencyjnym autorem tej pracy. W publikacji przedstawione zostały wyniki przeprowadzonego testu porównawczego metod wywoływania wariantów genetycznych. Porównane pod względem czułości i specyficzności zostały trzy narzędzia: DeepVariant, GATK i SpeedSeq. Wykorzystując wystandaryzowaną próbkę danych WGS habilitant wykonał stosowne analizy, a następnie porównał uzyskane wyniki pomiędzy narzędziami. Największa precyzja w wywoływaniu wariantów wykazana została w przypadku DeepVariant co jest bardzo interesujące, gdyż za złoty standard w przypadku wywoływania wariantów powszechnie przyjmuje się GATK. Przeprowadzona została także analiza czasu obliczeniowego potrzebnego do wywołania wariantów w jednej próbce. Analiza ta wykazała, że czas potrzebny na wywołanie wariantów z wykorzystaniem DeepVariant był znacznie krótszy w porównaniu z innymi programami przy niewielkich wymaganiach mocy obliczeniowej.

Czwarta z publikacji stanowiących osiągnięcie habilitacyjne dotyczy identyfikacji istotnych wariantów genetycznych w syndromie Penttinen. Dr Stokowy wykonał analizy danych WES (whole exome sequencing), a następnie wobec braku pozytywnych wyników, także danych WGS (whole genome sequencing), pochodzących od pacjentki z Norwegii i jej rodziców oraz pacjenta z Australii. Pacjenci mieli podobne i bardzo poważne objawy syndromu Penttinen. Rezultatem analiz była

identyfikacja nowego wariantu w genie *PDGFRB* w rejonie kodującym domenę kinazy tyrozynowej. Wcześniej poznane warianty dotyczące tego samego rejonu powiązane były z syndromami przedwczesnego starzenia. W nowym, zidentyfikowanym przez habilitanta wariacie, adenina zastąpiona jest guaniną w pozycji 1997 co prowadzi do zmiany asparaginy na serynę. Identyfikacja wariantu umożliwiła badania funkcjonalne, wskazujące na zwiększoną fosforylację kodowanego białka *PDGFRβ* jak i fosforylację niektórych kolejnych białek sygnałowych. Zaobserwowane zostały także zmiany w transkrypcji regulowanej białkiem *STAT*. Badania pozwoliły na wskazanie potencjalnej opcji terapeutycznej dzięki czemu praca jest szczególnie istotna i kompletna, od identyfikacji wariantów do terapii, co nie jest częste. Publikacja opisująca te wyniki ukazała się w czasopiśmie *European Journal of Human Genetics*, dr Stokowy jest drugim z 13 autorów.

Piąta publikacja również dotyczy wariantów genetycznych powiązanych z chorobami, w tym przypadku wariantów 117 genów istotnych w procesie mielinizacji. Celem pracy była ocena tych wariantów jako czynników ryzyka schizofrenii. Publikacja ukazała się w czasopiśmie *Scientific Reports*. Dr Stokowy jest pierwszym z dwunastu autorów.

Pierwszym etapem badawczym było przeszukanie bazy Gene Ontology Consortium za pomocą terminów GO opisujących powiązane z mielinizacją funkcje genów. Umożliwiło to stworzenie zestawu genów, potencjalnie istotnych w rozwoju choroby, których warianty będą poddane dalszej analizie. Zadanie to tylko pozornie było proste. Tego typu przeszukiwanie, nawet tak dobrze zorganizowanej bazy jaką jest baza GO, wiąże się z koniecznością wielokrotnego ręcznego sprawdzania i korygowania wyników oraz wykluczenia genów, których funkcjonalna adnotacja była słabo udokumentowana co z kolei wymaga intensywnego przeszukiwania literatury. Wybrane 117 genów dr Stokowy przeanalizował następnie pod kątem istniejących wariantów i ich potencjalnej sprawczości. W analizach wykorzystał dostępne dane badań asocjacyjnych (GWAS), exome-chip i WES (z ang. whole exome sequencing) pochodzących od kilkudziesięciu tysięcy pacjentów i kontroli. Analiza zarówno powszechnych jak i rzadkich wariantów kodujących wykazała istotność rzadkich wariantów w genie *LRP1*. Jednak po wprowadzeniu korekty na wielokrotne testowanie, warianty te nie osiągały już istotnego poziomu zróżnicowania pomiędzy chorymi i zdrowymi. Z kolei analiza wariantów, które utraciły funkcje (wariantów niekodujących) pozwoliła na potwierdzenie powiązania wariantów genów *SREBF1* i *SREBF2* ze zwiększonym ryzykiem schizofrenii. Uzyskane wyniki doprowadziły habilitanta do konkluzji, że warianty w genach związanych z mielinizacją nie są głównym czynnikiem ryzyka dla schizofrenii.

Podsumowując osiągnięcie habilitacyjne dra Tomasza Stokowego można stwierdzić, że przeprowadzone przez niego badania istotnie przyczyniły się do rozwoju metod badawczych związanych z analizą wariantów genetycznych i ich powiązaniem z chorobami. Przedstawione w publikacjach badania są nie tylko ciekawe i nowatorskie, ale także w niezwykle istotny sposób przyczyniają się do rozwoju dyscypliny. Co ważne, dzięki wypracowanej przez dra Stokowego metodyce możliwe było zidentyfikowanie wariantów będących przyczyną chorób genetycznych człowieka, keratolitycznego rumienia zimowego oraz syndromu Penttinena. Ważnym osiągnięciem jest także wykazanie, że rzadkie warianty genetyczne związane z mielinizacją nie są głównym czynnikiem ryzyka odpowiedzialnym za dziedziczenie schizofrenii. Jest to być może wynik nie spełniający oczekiwań habilitanta, gdyż analizy podjął się przede wszystkim w celu zidentyfikowania istotnych czynników, ale wykluczenie grupy genów, choć być może mniej spektakularne, jest niewątpliwie ważne. Praktyczne zastosowanie opracowanych przez dra Stokowego metod nie kończy się na wymienionych w osiągnięciu habilitacyjnym publikacjach.

Zostały one bowiem wdrożone w ramach oferty diagnostycznej we współzałożonej przez habilitanta firmie diagnostycznej MNM Diagnostics. Dr Tomasz Stokowy jest niewątpliwie bardzo dobrze przygotowany do prowadzenia dalszej samodzielnej pracy, a przedstawione publikacje stanowią bardzo istotne osiągnięcie w obszarze badań genetycznych chorób człowieka.

Ocena pozostałego dorobku naukowego i aktywności naukowej

Dr Tomasz Stokowy w roku 2009 ukończył studia magisterskie i inżynierskie na Politechnice Śląskiej. Pracę magisterską zatytułowaną „Classification of DNA microarray data with random forests” napisał pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Krzysztofa Fajarewicza. W tym samym roku rozpoczął studia doktoranckie. Stopień doktora nauk technicznych otrzymał w roku 2013 na Wydziale Automatyki, Informatyki i Elektroniki Politechniki Śląskiej w Gliwicach. Promotorem pracy doktorskiej zatytułowanej „Selection of miRNA isoform markers differentiating between follicular thyroid cancer and follicular thyroid adenoma from high-throughput sequencing data” był również prof. dr hab. inż. Krzysztof Fajarewicz. Po ukończeniu studiów doktoranckich dr Stokowy odbył trzyletni staż na Uniwersytecie w Bergen. W czasie stażu podoktorskiego na Wydziale Medycyny dr Stokowy zajmował się analizami genomu człowieka rozwijając swój warsztat badawczy. W szczególności skupiał się na analizie rzadkich wariantów genetycznych. Po ukończeniu stażu habilitant pozostał w Bergen i w roku 2016 rozpoczął pracę w uniwersyteckiej jednostce wspierającej projekty badawcze w zakresie sekwencjonowania i analiz bioinformatycznych. W jednostce tej zatrudniony jest do tej pory i zajmuje się przede wszystkim projektowaniem i implementacją rozwiązań bioinformatycznych dla diagnostyki medycznej pozostając przy zagadnieniach dotyczących chorób rzadkich i nowotworowych. W latach 2016-2017 dr Stokowy zatrudniony był także w Szkole Medycznej Yale. W roku 2019 podjął współpracę z Uniwersytetem Medycznym w Gdańsku jako konsultant Centrum Analiz Biostatystycznych i Bioinformatycznych gdzie przede wszystkim skupia się na zadaniach związanych z rozwojem technologii analizy płynnych biopsji. Kariera naukowa dr Tomasza Stokowego przebiegała zatem w kilku różnych instytucjach co nie tylko pozwoliło na zdobycie dużego doświadczenia, ale świadczy także o bardzo dynamicznym, zaangażowanym podejściu do pracy naukowej. Wróży również dobrze na dalsze etapy rozwoju.

W dorobku naukowym wykazanym przez habilitanta, poza pięcioma pracami stanowiącymi osiągnięcie, znajduje się 36 publikacji, które ukazały się po uzyskaniu stopnia doktora. Niemal wszystkie te prace opublikowane zostały w czasopismach znajdujących się na liście JCR. W pięciu z tych publikacji dr Stokowy jest pierwszym autorem, a w kolejnych pięciu drugim. W pozostałych pracach znajduje się na dalszych miejscach. Uwagę zwraca stosunkowo mała liczba prac, w których dr Stokowy jest wiodącym autorem. Nie jest to jednak czymś wyjątkowym, a raczej dość częstym, w przypadku osoby zajmującej się bioinformatyką i współpracującej z wieloma grupami badawczymi. Wyniki pracy są natomiast świetne. W chwili obecnej całkowity dorobek habilitanta, według bazy Web of Science, wynosi 63 publikacje, które cytowane były 716 razy. Indeks Hirsha wynosi 18. Dorobek ten z pewnością można uznać za imponujący zważywszy etap kariery zawodowej dra Tomasza Stokowego. Bogaty i zróżnicowany tematycznie dorobek publikacyjny habilitanta świadczy o umiejętności nawiązywania współpracy, a także o tym, że jego wiedza związana z analizą danych jest doceniana i habilitant chętnie włączany jest do zespołów przez innych badaczy.

Współpraca nie ogranicza się natomiast do najbliższego otoczenia, wiele z publikacji, których współautorem jest dr Stokowy powstało we współpracy międzynarodowej.

Tematyka opublikowanych prac związana jest z szeregiem zagadnień z obszaru analizy transkryptomów i genomów. W większości przypadków badania dotyczyły chorób człowieka. Dr Stokowy zaangażowany był głównie w analizy różnego rodzaju danych z wysokoprzepustowych technologii, w tym danych z mikromacierzy i sekwencjonowania i dotyczyły zarówno mRNA, mikroRNA, egzomów jak i całych genomów. Dr Stokowy wykonywał zarówno analizy danych jak i pracował nad rozwijaniem narzędzi i metod bioinformatycznych.

Wyniki swojej pracy dr Stokowy prezentował na konferencjach oraz podczas wizyt w różnych instytucjach naukowych, w tym tak renomowanych jak Uniwersytet Stanforda czy Uniwersytet Yale. Na podkreślenie zasługuje udział habilitanta w realizacji wielu projektów badawczych i badawczo-rozwojowych. W większości przypadków był w projektach tych wykonawcą, ale kierował także badaniami, na których realizację otrzymał finansowanie z Fundacji Meltzer'a. Jednym z istotnych elementów oceny badacza jest jego rozpoznawalność w świecie naukowym. O tym, że habilitant dał się rozpoznać jako kompetentny naukowiec świadczą nie tylko liczne współprace, ale i powołanie do grona ekspertów przez Agencję Badań Medycznych oraz przez Research Council Faroe Islands. Dr Stokowy recenzował także aplikacje do Studium Medycyny Molekularnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Dr Tomasz Stokowy wykazał się także aktywnością dydaktyczną. Prowadził zajęcia dla studentów na kilku uczelniach: Politechnice Śląskiej w Gliwicach, Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Uniwersytecie w Bergen, Warszawskim Uniwersytecie Medycznym i Gdańskim Uniwersytecie Medycznym. Były to zarówno zajęcia dla studentów studiów I i II stopnia jak i w ramach studiów doktoranckich czy też, jak w przypadku Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, w ramach Letniej Szkoły Biotechnologii.

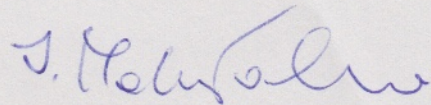
Podsumowując, kariera zawodowa dra Stokowego obejmuje szerokie doświadczenie zebrane w różnych ośrodkach w Polsce i za granicą i dowodzi bardzo wysokiego poziomu przygotowania do pracy naukowej. Dr Tomasz Stokowy wykazuje się umiejętnościami i doświadczeniem niezbędnymi do samodzielnego prowadzenia badań. Posiada umiejętność pozyskiwania funduszy na badania i nawiązywania współpracy naukowej z badaczami z innych ośrodków. Habilitant świetnie rozwinął swój warsztat badawczy, a podejmowana tematyka jest niezwykle istotna. Ekspertyza dr Stokowego ma dużą wartość dla badań prowadzonych przez innych naukowców. Bardzo wysoko oceniam jego osiągnięcia na tym etapie rozwoju kariery naukowej.

Podsumowanie i wnioski końcowe

Po szczegółowej analizie przedstawionej dokumentacji osiągnięcia naukowego, całokształtu działalności naukowej, osiągnięć naukowo-badawczych, dorobku dydaktycznego jak również poziomu współpracy międzynarodowej, stanowiących wspólnie podstawę postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego, bardzo wysoko oceniam dorobek dra Tomasza Stokowego. Cykl publikacji dotyczących wywoływania i analizy wariantów genomowych stanowi nowatorski i bardzo ważny wkład do badań biomedycznych. Stwierdzam też, że osiągnięcia Pana dra Tomasza Stokowego odpowiadają wymogom, jakie zgodnie z Ustawą o Stopniach Naukowych i Tytułach Naukowych z dnia 20 lipca 2020 r. powinien spełniać kandydat ubiegający się o stopień doktora habilitowanego. Dlatego zwracam się do Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu

Medycznego w Gdańsku o nadanie Panu dr Tomaszowi Stokowemu stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne. Jestem też przekonana, że rozpatrywane osiągnięcie zasługuje na wyróżnienie, gdyż obejmuje prace o bardzo wysokim poziomie naukowym i dużym znaczeniu dla rozwoju dziedziny.

Z poważaniem,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'J. Holubowicz', is written in a cursive style.