



UNIwersYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Wrocław, 08. 04. 2018

Recenzja

rozprawy doktorskiej pani magister Magdaleny Sochy
pt. „Molekularne mechanizmy patogenezy
w wybranych wrodzonych wadach kończyn u człowieka”
przygotowana na podstawie decyzji
Rady Wydziału Lekarskiego
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Rozprawa doktorska pani mgr Magdaleny Sochy jest wynikiem rozległych badań nad molekularnym podłożem wrodzonych wad kończyn (WWK) u człowieka. Autorka podjęła się badań nad tym problemem z powodów poznawczych z uwagi na brak dostatecznej wiedzy o patomechanizmach wad kończyn oraz wiedzy praktycznej mającej znaczenie kliniczne i diagnostyczne, a także z uwagi na heterogenność podłoża molekularnego wad kończyn oraz duży odsetek pacjentów z niezdiagnozowaną przyczyną malformacji kończyn, nawet pacjentów z obciążeniem rodzinnym. Jak wynika z analizy publikacyjnej (baza *PubMed*) Doktorantka ma znaczący dorobek naukowy dotyczący tematyki wad układu kostnego u ludzi, stąd już na początku recenzji podkreślam to, jako znaczące dla wyboru tematyki pracy doktorskiej. Powyższe wstępne uwagi świadczą o trafności podjętej przez Doktorantkę problematyki.

Znajomość przyczyny zaburzeń rozwojowych u ludzi pozwala określić rokowanie, właściwe dalsze postępowanie diagnostyczne, terapeutyczne i rehabilitacyjne oraz umożliwia zastosowanie odpowiedniej profilaktyki współistniejących chorób. Właściwe rozpoznanie ma także istotne znaczenie dla poradnictwa rodzinnego. Poznawanie przyczyn zaburzeń rozwojowych u ludzi ma też wymiar naukowy – pozwala lepiej poznać patogenezę chorób i potencjalnie stwarza możliwość leczenia czy zapobiegania schorzeniom w przyszłości. Zaburzenia rozwojowe dotyczą niejednokrotnie pacjentów ze złożoną i skomplikowaną historią chorobową określane są jako choroby rzadkie. Choroba rzadka zwana inaczej chorobą sierocą (*orphan disorder*) oznacza jednostkę chorobową, która występuje w populacji z częstością 1 na 2000 osób lub rzadziej. Czasem nawet częstość występowania tych chorób wynosi 1:100 tysięcy czy 1:500 tysięcy urodzeń – wtedy nazywamy je chorobami ultrarzadkimi. Zdefiniowano blisko 8 tys. chorób rzadkich, których lista jest nadal otwarta (www.orpha.net). WWK również z definicji częstości występowania należą do chorób rzadkich.

Etiologia zaburzeń rozwoju jest niezwykle złożona, dlatego ich diagnostyka niejednokrotnie wymaga długich, pracochłonnych oraz kosztownych badań, które nie zawsze kończą się sukcesem. Mnogość oraz różnorodność zespołów dysmorficznych, stosunkowo niska częstość ich występowania, trudności w ocenie cech dysmorficznych, oraz zmienne cechy fenotypowe w tej samej chorobie powodują trudności w sformułowaniu ostatecznego rozpoznania.

Przedstawiona do recenzji praca obejmuje 172 strony z tradycyjnym podziałem na wstęp, cele pracy, materiał i metody badań, wyniki oraz dyskusję i wnioski, spis używanego piśmiennictwa i streszczenie w języku polskim i angielskim oraz spis tabel i rycin, wykazy stosowanych skrótów oraz 5 załączników.

Badania wykonane przez Doktorantkę wykonywane były w trzech jednostkach naukowych. W Polsce: w Katedrze Genetyki Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu oraz w Niemczech: w Instytucie Genetyki Molekularnej im. Maxa Plancka w Berlinie oraz Instytucie Genetyki Człowieka i Genetyki Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Berlinie. Badania, które są podstawą rozprawy doktorskiej pani mgr Magdaleny Sochy były finansowane z projektu badawczego NCN (UMO-2011-03-D-NZ2-06136) oraz badania wykonywane w Niemczech były finansowane ze środków Niemieckiej Wspólnoty Badawczej, Berlińskiego Instytutu Zdrowia oraz Stowarzyszenie im. Maxa Plancka. Badania naukowe mgr Magdaleny Sochy uzyskały zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Ocena pracy doktorskiej:

Ocena pracy doktorskiej obejmowała ocenę merytoryczną i metodologiczną pracy oraz podsumowanie i wnioski końcowe.

We Wstępie Autorka szczegółowo przedstawiła kliniczne i molekularne podstawy zagadnień, którymi zajęła się w swojej pracy badawczej: klasyfikację wad rozwojowych kończyn, definicję i podział wad kończyn oraz ich etiopatogenezę ogólną i molekularną. Na uwagę zasługuje przedstawianie embriogenezy kończyn u kręgowców, co jest uzasadnione w tej dysertacji podjęciem badań funkcjonalnych na modelach mysich. Następnie Doktorantka jako biotechnolog molekularny skupiła się na szczegółowym omówieniu organizacji przestrzennej genomu eukariotycznego i regulacji ekspresji genów, wariantów o nieokreślonej patogenności oraz metod analiz funkcjonalnych w badaniach nad przyczynami WWK, co również ma uzasadnienie w dalszych rozdziałach dysertacji.

Szczególnie wartościowe pod względem edukacyjnym jest dokładne omówienie i opisanie przez panią mgr Magdalenę Sochę elementów regulatorowych genomu wpływających na ekspresję genów oraz wpływu wariantów strukturalnych na regulację ekspresji genów, co jest zrozumiałe z uwagi na główny temat pracy i wykształcenie biotechnologiczne Doktorantki. We wstępie Doktorantka czytelnie wyjaśniała zawile aspekty biologiczne na dobrze wykonanych i logicznych rycinach.

Spośród uwag redakcyjnych w tej części, jedyną, jaką mam do przemyślenia, to pisownia nazw zespołów dysmorficznych składających się co najmniej dwóch nazwisk zachodnich naukowców-lekarzy. Uważam, że powinniśmy pisać zespół Saethrego i Chotzena (zamiast Saethrego-Chotzena), czy zespół Bardeta i Biedla itp.

Wstęp stanowi szczegółowe i rzetelne omówienie poruszanych zagadnień, w oparciu o szeroką i aktualną literaturę i pozwala czytelnikowi na zapoznanie się z problemami, na których Doktorantka skupia się w swojej pracy badawczej. Przedstawiona wnikliwa analiza aktualnej literatury nie pozostawia wątpliwości, że decyzja Doktorantki o kierunku prowadzonych badań jest w pełni uzasadniona zakresem obecnej wiedzy, zarówno z naukowego, jak i klinicznego punktu widzenia.

Cel rozprawy doktorskiej pani mgr Magdaleny Sochy został sformułowany szeroko i ambitnie, co potwierdza dojrzałość naukową Doktorantki. Głównym założeniem Doktorantki było zidentyfikowanie nowych przyczyn powstawania wrodzonych wad kończyn u człowieka, poprzez wykorzystanie nowoczesnych analiz diagnostycznych i badań funkcjonalnych na mysich modelach. W Swojej dysertacji Autorka postawiła sobie trzy cele szczegółowe:

1. Wytypowanie nowych, nieopisanych zmian genetycznych, stanowiących prawdopodobną przyczynę wrodzonych wad kończyn u człowieka.
2. Opisanie nowych patomechanizmów leżących u podstaw rozwoju wad kończyn u człowieka w efekcie zastosowania nowoczesnych analiz funkcjonalnych.
3. Poprawa diagnostyki molekularnej, opieki genetycznej i poradnictwa genetycznego w grupie pacjentów z WWK.

W rozdziale Materiał i metody Autorka dokładnie opisała kryteria włączenia pacjentów do swoich badań oraz sposób prowadzenia oceny klinicznej przez współpracującego lekarza genetyka, będącego jednocześnie Promotorem pracy. Badaniami w ocenianej pracy została objęta grupa 64 probandów z WWK, z której 10 stanowiły przypadki rodzinne (15,6%). Izolowaną postać wady obserwowano u 23 probandów (35,9%), a w 41 przypadkach (64,1%) wrodzonej malformacji kończyn towarzyszyła co najmniej jedna dodatkowa wada wrodzona i/lub niepełnosprawność intelektualna. Doktorantka przedstawiła wyniki 319 badań molekularnych wykonanych wspomnianych 64 probantów. Z punktu widzenia klinicznego, na szczególne podkreślenie zasługuje logiczny schemat postępowania diagnostycznego, który zakładał przeprowadzanie następujących po sobie etapów badań genetycznych w zależności od uzyskanych wyników. Zgodnie z tym założeniem, identyfikację przyczyny molekularnej omawianych wad prowadzono począwszy od najczęstszych zmian typowych dla danego klinicznego typu wad kończyn, przez zmiany rzadziej opisywane w literaturze, aż po poszukiwanie nowych przyczyn molekularnych wad kończyn stosując badania szeroko przepustowe, jak badania do mikromacierzy o wysokiej rozdzielczości i sekwencjonowanie eksomu, a także stosując czysto naukowe badania funkcjonalne w celu udowodnienia patogenności identyfikowanych wariantów.

W kolejnym etapie tego rozdziału Doktorantka omówiła szeroko i szczegółowo odczynniki używane do rozległych badań genetycznych oraz metody badawcze użyte w pracy począwszy od izolacji DNA, poprzez sekwencjonowanie metodą Sangera, badania MLPA, badania porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy w formacie 8x60k i 3x1,4M, badania metodą ilościową PCR, badania nad mapowaniem punktów złamań chromosomowych oraz sekwencjonowanie eskomu (WES), skończywszy na najważniejszym narzędziu naukowych użytym w pracy: badaniach funkcjonalnych, w tym hodowlach komórkowych, tworzeniu, utrzymaniu i krzyżowaniu linii transgenicznych myszy, edycji genomu mysich embrionalnych komórek macierzystych (mESCs) systemem CRSIPR/Cas9 (co wymaga szczególnego podkreślenia i uznania dla Doktorantki) oraz badaniu embrionów mysich.

Większość badań Doktorantka przeprowadziła samodzielnie, natomiast jeżeli badanie było przeprowadzane przez inny zespół, Doktorantka skrupulatnie to odnotowywała.

Podsumowując tę część rozprawy stwierdzam, iż jestem pod wrażeniem dociekliwości naukowej doktorantki, różnorodności testów zastosowanych przez panią mgr Magdalенę Sochę do rozwiązania problemu badawczego, a szczególnie skomplikowanych badań funkcjonalnych, które skupiają się na ocenie patogenności wyników molekularnych poszczególnych pacjentów czy jednej rodziny z wadą kończyn. Ten rozdział dysertacji dowodzi jednoznacznie, że pani mgr Magdalena Socha jest niezwykle szeroko wykształconym biotechnologiem o wyjątkowej umiejętności wykorzystania istniejących narzędzi badawczych w medycynie molekularnej dla rozwiązywania skomplikowanych i wielowątkowych problemów naukowych, jak również naukowcem potrafiącym prowadzić analizę genotypowo-fenotypową, co jest niezmiernie ważną umiejętnością przy korzystaniu z nowoczesnych technik molekularnych.

Rozdział Wyniki jest bardzo dobrze napisanym tekstem, z logicznym układem. Z punktu widzenia genetyka klinicznego, pediatry, dysmorfologa, ten rozdział najbardziej pokazuje ogrom wykonanej pracy w ocenianej dysertacji. W rozdziale „Wyniki” Doktorantka omówiła szczegółowo wyniki 319 badań molekularnych wykonanych u 64 probandów i ich krewnych, w przypadku badań rodzinnych (162 rutynowe badania diagnostyczne, tj. badania wykonane metodą sekwencjonowania Sangera i MLPA, 42 badania aCGH, 35 badań qPCR oraz 80 badań WES). W każdym z podrozdziałów Sekcji Wyniki, Pani mgr Magdalena Socha szczegółowo opisała poszczególnych pacjentów i ich rodziny według jednolitego schematu z uwzględnieniem aspektów klinicznych (zdjęcia wad kończyn u poszczególnych pacjentów, rodowód opracowany graficznie) i molekularnych (graficznie opracowane wyniki badań molekularnych i funkcjonalnych). Korzystanie przy opisie wyników z tego samego schematu ułatwia czytającemu analizę wyników i jednocześnie pokazuje rzetelność pracy i dokładność Doktorantki w opracowywaniu wyników swoich badań.

W przebiegu rutynowych badań genetycznych potwierdzono rozpoznanie kliniczne wrodzonej wady kończyn lub zespołu wad o znanym podłożu genetycznym u 8 probandów (12,5%), tj. w 6 przypadkach rodzinnych i 2 sporadycznych. Spośród wykonanych 42 badań aCGH (38 z wykorzystaniem mikromacierzy w formacie 3x1,4M, a 4 mikromacierzy w formacie 8x60k), u 6 probandów (wszystkie przypadki sporadyczne) zidentyfikowano nowe, nie opisywane wcześniej zmiany genomowe. Ponadto u dwóch probantów ze zidentyfikowaną wcześniej duplikacją w regionie 10q24.32 oraz u jednego probanda z nowym wariantem CNV w *locus* 7q31.32, kontynuowano badania poznawcze. Sekwencjonowanie całego eksomu (WES) wykonano w 27 (42,2%) przypadkach, tj. 23 przypadkach sporadycznych i 4 rodzinnych WWK

(ogółem aż u 80 osób). W badaniach WES, w 2 (7,4%) przypadkach rodzinnych i 4 (14,8%) przypadkach izolowanych WWK wykryto nowe, nieopisane wcześniej warianty potencjalnie patogenne. Spośród opisywanych wariantów, 4 wykryto w genach kandydujących, tj. genach dotychczas niepowiązanych z wadami kończyn: w genie *NCKAP1*, w genie *BTAF1*, w genie *FZD3* oraz w genie *KBTD7* u probanda z asocjacją VACTERL. U dwóch pacjentów wykryto mutację w znanych genach: w genie *SALL4* oraz w genie *FGF8*.

W dwóch nieopisywanych wcześniej w literaturze duplikacjach, wykrytych w badaniu aCGH (duplikacja w *locus* 10q24.32 oraz duplikacja w *locus* 7q31.32), wykonano badania funkcjonalne z użyciem systemu CRISPR/Cas9, wcześniej dobrze opisane w rozdziale Metody. Badania funkcjonalne wykonano także dla wariantów w genach *FZD3* i *KBTD7* zidentyfikowanych w badaniu WES. W przebiegu badań funkcjonalnych wygenerowano 9 linii transgenicznymy myszy. Udowodniono patogenność duplikacji w *locus* 10q24.32 u dwóch probandów, jako nowo zidentyfikowanej przyczyny hipoplazji kości udowych i miednicy. W przypadku modelu mutanta *Fzd3trunc/trunc* obserwowane wady były identyczne z wadami opisywanymi dla modelu *knock-out* genu *Fzd3*. U pozostałych 6 chimer mysich nie obserwowano wad występujących u probandów ani innych wad rozwojowych.

Rozdział Wyniki Doktorantka urozmaiciła i podsumowała klarownymi tabelami, w których zawarte są wszystkie stwierdzone zmiany wśród badanych pacjentów ze statusem dziedziczenia oraz krytyczną klasyfikacją jako zmiany patogenne czy nowe warianty o niejednoznacznej patogenności.

Z punktu widzenia genetyka klinicznego poszukującego przyczyny zaburzeń rozwojowych powyższe liczby, tj 319 badań u 64 probantów, są niezbitym dowodem na złożoność całego procesu diagnostycznego, który nie zawsze kończy się sukcesem i który cały czas wymaga wsparcia naukowego, w którym wykonywane są liczne pracochłonne i kosztowne badania potwierdzające patogenność wykazanych zmian.

W tym Rozdziale Doktorantka nie ustrzegła się pojedynczych błędów redakcyjnych, jak np.: „u probandka wykonano badanie kariotypu“ (str 94) oraz „jako wariant o niekreślonej patogenności“ (str 111). Szeroki zakres wykonanych badań oraz rozległość wyników, zupełnie usprawiedliwiają doktorantkę w tych raptem kilku błędach redakcyjnych. Nie dostrzegłem żadnego błędu merytorycznego.

Rozdział Doktorantki Dyskusja jest kwintesencją naukowej analizy, dokładnie i dobitnie tłumaczący uzyskane wyniki badań własnych. Przyznaję, że była to bardzo interesująca lektura, szczególnie, że omawiane problemy dotyczą chorób rzadkich. Doktorantka dokładnie omówiła wyniki swoich badań próbując rzetelnie wyjaśnić negatywne

rezultaty wnikając w tajniki wiedzy na temat mechanizmów molekularnych wad kończyn. Najwięcej miejsca w Dyskusji Doktorantka przeznaczyła na krytyczne omówienie wyników badań metodą porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy oraz metodą sekwencjonowania eksomu, obejmujące zarówno nowe zmiany genetyczne o charakterze patogennym, jak i o nieokreślonej patogenności z podkreśleniem wyników badań funkcjonalnych. Ta część Dyskusji była najbardziej intrygująca naukowo. Podsumowaniem wyników badań funkcjonalnych, które nie przyniosły oczekiwanych rezultatów, były hipotezy Doktorantki, że fenotyp pacjentów ze zidentyfikowanymi zmianami o nieokreślonej patogenności, może być związany dodatkowo z innymi czynnikami modyfikującymi, zarówno niegenetycznymi jak i genetycznymi (inne warianty CNV powodujące zaburzenie lokalnego środowiska regulatorowego genów oraz mutacje w innych genach składających się na dziedziczenie dwugenowe jak i wielogenowe). Doktorantka zauważa, że wysoce prawdopodobne jest, że u wielu pacjentów pozostających bez diagnozy molekularnej, wada kończyn jest uwarunkowana bardzo niewielką zmianą w regionie pozagenowym, który pełni funkcję regulatorową. Ponadto Doktorantka podkreśla, że identyfikacja zmian w sekwencjach niekodujących genów nadal stanowi ogromne wyzwanie techniczne i interpretacyjne. Cenną i słuszną uwagą jest stwierdzenie Doktorantki w omawianej dyskusji, że na sukces diagnostyczny przy zastosowaniu metody aCGH ma wpływ przede wszystkim dolna granica wykrywalności mikromacierzy, tj. rozdzielczość, natomiast w badaniu WES głównym czynnikiem ograniczającym wykrywalność mutacji jest głębokość sekwencjonowania oraz prawidłowa obróbka bioinformatyczna danych. Stąd istnieje potrzeba wielokrotnego powracania do uzyskanych wyników badań genetycznych i ponownego ich analizowania, nie tylko o charakterze naukowym, jak badań typu aCGH, NGS, qPCR, ale i innych badań diagnostycznych.

Jeszcze raz na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorantka dokonała krytycznej analizy wyników własnych w odniesieniu do istniejącej wiedzy. Ma to szczególne znaczenie w sytuacji, kiedy niektóre wyniki badań pani mgr Magdaleny Sochy nie są jednoznacznie patogene, nawet po przeprowadzeniu badań funkcjonalnych.

Oceniając tą część rozprawy chciałbym podkreślić, że Doktorantka wykazała się wysoko ocenianą umiejętnością krytycznej analizy wyników badań własnych w odniesieniu do wyników z literatury światowej, ale również twórczym podejściem do zrozumienia mechanizmów molekularnych wad kończyn.

Całość postępowania badawczego pozwoliła Doktorantce na sformułowanie trzech powściągliwych i realistycznych wniosków, które pokrywają się z omówionymi powyżej wynikami Jej badań. W toku przeprowadzonych badań, Doktorantka zidentyfikowała nieopisane dotąd w piśmiennictwie medycznym patogene zmiany typu CNV i SNV oraz szereg potencjalnie



patogennych wariantów o nieokreślonej patogenności, które mogą leżeć u podstaw wrodzonych wad kończyn u człowieka. We wniosku numer 2 Doktorantka podkreśliła, że opisane nowe patomechanizmy, które mogą prowadzić do wystąpienia wrodzonych wad kończyn u człowieka oraz, że wyniki Jej pracy pokazały, że badanie patomechanizmów prowadzących do rozwoju WWK oraz udokumentowanie patogenności wielu zmian genetycznych o nieokreślonej patogenności jest niezwykle trudne bez nawiązywania wielośrodkowej i międzynarodowej współpracy na wielu poziomach i wykorzystania nowoczesnych analiz funkcjonalnych.

Uzyskane wyniki Doktorantka omówiła w odniesieniu do szerokiej, właściwie dobranej i aktualnej literatury dotyczącej sedna poruszanych zagadnień (223 pozycji, w znakomitej większości opublikowanych w ostatnich latach). Cytowane publikacje dowodzą znajomości przez Doktorantkę literatury przedmiotu oraz umiejętności korzystania z licznych i różnorodnych źródeł wiedzy.

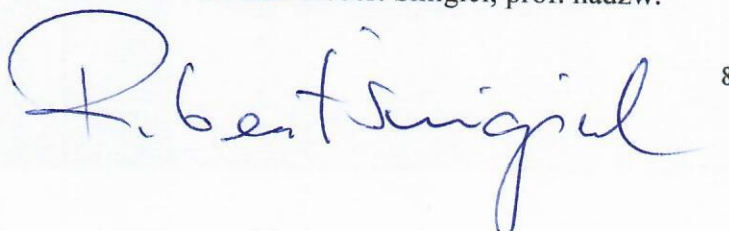
W podsumowaniu podkreślę, że uzyskane rezultaty mają znaczenie dla nauki i praktyki klinicznej, Doktorantka poprawnie formułuje problemy i założenia badawcze, wykazuje trafność doboru metod i narzędzi badawczych, umiejętność ich zastosowania. Dysertacja Doktorantki cechuje się prawidłowym układem pracy i struktury podziału treści, poprawnością formalno-językową. Rozprawa została również bardzo starannie przygotowana pod względem redakcyjnym. Znalazłem jedynie kilka błędów interpunkcyjnych czy ogólnie redakcyjnych, co oczywiście nie umniejsza wartości naukowej tej pracy.

Pragnę także podkreślić, że praca doktorska pani magister Magdaleny Sochy stanowi rzeczywisty wkład w rozwój wiedzy w zakresie poruszanych zagadnień. Oceniam ją bardzo wysoko. Jestem również przekonany, że z recenzowanej dysertacji powstanie nie jeden, ale co najmniej kilka artykułów oryginalnych i kazuistycznych o dobrym współczynniku IF.

W mojej ocenie rozprawa doktorska mgr Magdaleny Sochy spełnia wymogi, stawiane tego typu rozprawom i zwracam się do Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie pani magister Magdaleny Sochy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wnioskuję do Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o wyróżnienie dysertacji doktorskiej pani mgr Magdaleny Sochy nagrodą.

Dr hab. Robert Śmigiel, prof. nadzw.



8