

## Ocena rozprawy doktorskiej Pani mgr biotech. Magdaleny Sochy

**Tytuł rozprawy: Molekularne mechanizmy patogenezы w wybranych wrodzonych wadach kończyn u człowieka**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana pod kierunkiem dr hab. n. med. Aleksandra Jamsheera. Prace badawcze realizowane były w trzech jednostkach naukowych: w Katedrze i Zakładzie Genetyki Medycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, w Instytucie Genetyki Molekularnej im. Maxa Plancka w Berlinie oraz w Instytucie Genetyki Człowieka i Genetyki Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Berlinie (*Charité – Universitätsmedizin Berlin*).

Wybór tematu pracy doktorskiej Pani mgr biotech. Magdaleny Sochy uważam za interesujący i ważny, zarówno z poznawczego, jak i praktycznego punktu widzenia.

Pani Magdalena Socha podjęła badania mające na celu dotarcie do nowych przyczyn powstawania wrodzonych wad kończyn (WWK) u człowieka, poprzez wykorzystanie nowoczesnych analiz diagnostycznych i funkcjonalnych oraz mysich modeli zwierzęcych.

Przedstawiona do oceny praca ma typowy dla rozpraw doktorskich układ redakcyjny. Zawiera 180 stron maszynopisu, składa się z dziesięciu rozdziałów, streszczenia w języku polskim i w języku angielskim oraz wykazu stosowanych w pracy skrótów, spisu rycin i spisu tabel. Zawiera 64 ryciny, 25 tabel, oraz 223 pozycje piśmiennictwa. Rozprawę poprzedza informacja o źródłach finansowania badań przedstawionych w rozprawie [Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego o nr UMO-2011-03-D-NZ2-06136 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki, projektu badawczego o nr LIDER/008/431/L-4/12/NCBR/2013 finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju oraz projektu „Staże i szkolenia praktyczne pracowników/nic naukowych jednostek naukowych i pracowników/nic naukowych, naukowo-dydaktycznych i dydaktycznych uczelni w przedsiębiorstwach”, Poddziałanie 8.2.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego. Badania wykonane w Instytucie Genetyki Molekularnej im. Maxa Plancka w Berlinie oraz Instytucie Genetyki Człowieka i Genetyki Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Berlinie zostały sfinansowane ze środków Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG; Niemiecka Wspólnota Badawcza), Berliner Institut für Gesundheitsforschung (ang. *Berliner Institute for Health*, BIH) oraz Max Planck Gesellschaft (Stowarzyszenie im. Maxa Plancka)].

Projekt badawczy realizowany był po wcześniejszym pozytywnym zaopiniowaniu wniosku przez Komisję Bioetyczną przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

We Wstępie Doktorantka wskazuje na zaburzenia funkcjonowania ścieżek morfogenetycznych oraz środowisko regulatorowe genów, aktywnych na wczesnych etapach embriogenezy kończyn, jako elementów istotnych w patogenezы wrodzonych wad kończyn u człowieka. Mgr Magdalena Socha przedstawia



poziomu ekspresji RNA' wskazuje na konieczność modyfikacji zastosowanego protokołu badawczego lub wymaga szerszego wyjaśnienia.

W pierwszej części rozdziału poświęconego uzyskanym wynikom Autorka omawia pozytywne wyniki rutynowych badań genetycznych u pacjentów, w przypadkach rodzinnych i sporadycznych, uzyskanych z wykorzystaniem sekwencjonowania metodą Sanger (w podrozdziale 4.1.1.) oraz metodą MLPA (w podrozdziale 4.1.2). Wyniki badań dla poszczególnych probandów i członków ich rodzin zostały dokładnie opisane w powtarzającym się schemacie, co pozwala na łatwe śledzenie informacji przez czytającego oraz porównanie kolejnych wyników, przy ich mnogości i złożoności. Na rycinach przedstawione zostały: obraz kliniczny wad kończyn u danego probanda i członków rodzin w przypadkach rodzinnych, rodowody w przypadkach rodzinnych, obraz aberracji wykrytej techniką aCGH (jeżeli badanie było przeprowadzone), jak również warianty sekwencji będące przedmiotem szczegółowych analiz. Rycinom towarzyszą starannie opracowane opisy. W 4.1.3. *Podsumowaniu wyników rutynowych badań molekularnych* Autorka zamieściła tabelę, w której zebrane zostały najważniejsze informacje o rozpoznanych wariantach sekwencji, obejmujące klasyfikację wariantu jako nowy (rozpoznano sześć wariantów) lub znany wariant patogenny (rozpoznano dwa warianty).

Po wykluczeniu znanych przyczyn WWK lub zespołu wad mnogich towarzyszących WWK, lub gdy opisany fenotyp nie miał znanego podłoża genetycznego, wykonywano badanie z wykorzystaniem porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy oligonukleotydowej (aCGH). W podrozdziale, 4.2. *Wyniki badań aCGH*, Doktorantka najpierw opisuje uzyskane wyniki dla pacjentów, u których wykryto nowe zmiany genomowe w badaniu aCGH (podrozdział 4.2.1.), a następnie wyniki pozyskane dla pacjentów, u których wykryto w aCGH nowe zmiany genomowe, poddane badaniom funkcjonalnym (podrozdział 4.2.2.). U sześciu (wszystkie przypadki sporadyczne, oznaczone od III-1 do III-5 oraz III-8) z 36 probandów poddanych badaniu aCGH, zidentyfikowano nowe zmiany genomowe, nie opisywane wcześniej w populacjach osób zdrowych, ani u pacjentów z podobnym fenotypem, do których należą interstycjalne duplikacje (w *locus* 8q12.1 o wielkości 2,982 Mpz; w chromosomie Xp22.2 o wielkości 76,5 kpz i w chromosomie 7q31.32 o wielkości 214,359 kpz) oraz interstycjalne delecje w *locus* 13q14.2 o wielkości 1,771 Mpz, w *locus* 12q24.13-q24.21 o wielkości 1,794 Mpz i w *locus* 9q33.1-q33.2 o wielkości 2,5 Mpz).

Wykorzystując technikę CRISPR/Cas9 odtworzono dwie aberracje wykryte u probandów III-6 i III-8 w mysich embrionalnych komórkach macierzystych (mESCs) i wykonano analizę fenotypu uzyskanych mutantów. Ponadto u pacjentki III-6 przeprowadzono analizę zmiany profilu interakcji w obrębie duplikacji w *locus* 10q24.32 przy użyciu techniki *Circular Chromosome Conformation Capture sequencing* (4C-seq). U pacjenta III-8 wykonano badania w kierunku potwierdzenia obecności przewidywanego transkryptu fuzyjnego, który miał powstawać wskutek duplikacji w *locus* 7q31.32. Dzięki nawiązanej współpracy z ośrodkiem we Francji (Service de Génétique, CHU Caen), możliwe było poddanie badaniom drugiej pacjentki (III-7) z hipoplazją kości udowych i miednicy, u której w badaniu aCGH również wykryto duplikację w *locus* 10q24.32. Dzięki zastosowaniu badań funkcjonalnych wykazano, że wykryte u pacjentek



Stwierdzam, że Doktorantka cele pracy zrealizowała, a na podstawie uzyskanych wyników sformułowała prawidłowo wnioski. Cytowane pozycje literaturowe zostały właściwie dobrane i prawidłowo wykorzystane w tekście rozprawy doktorskiej.

Mimo kilku uwag, przedstawioną mi do oceny rozprawę doktorską Pani mgr biotech. Magdaleny Sochy oceniam bardzo dobrze. Zaplanowane badania zrealizowane zostały z powodzeniem przez Doktorantkę z wykorzystaniem technik rutynowo stosowanych w laboratoriach diagnostycznych, jak również przy użyciu najnowszych narzędzi badawczych, do których należą sekwencjonowanie całego eksomu, edycja genomu mysich embrionalnych komórek macierzystych (mESCs) systemem CRSIPR/Cas9 oraz analizy 4C-seq. Prace badawcze Doktorantki doprowadziły do uzyskania oryginalnych wyników. Mgr Magdalena Socha przyczyniła się znacząco do poszerzenia wiedzy o wariantach sekwencji warunkujących dany fenotyp w różnych typach wrodzonych wad kończyn u ludzi.

W mojej opinii najważniejszym wymiernym wynikiem prac badawczych Pani mgr biotech. Magdaleny Sochy jest identyfikacja nowych wariantów sekwencji, nieopisanych dotąd w piśmiennictwie medycznym patogennych zmian typu CNV i SNV oraz szeregu wariantów o nieokreślonej obecnie patogenności (VUS). Wyniki uzyskane w badaniach mgr Magdaleny Sochy, po opracowaniu protokołów diagnostycznych, mogą znaleźć praktyczne zastosowanie w diagnostyce molekularnej WWK.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr biotech. Magdaleny Sochy odpowiada wymogom stawianym rozprawom na stopień naukowy doktora, zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595; z późn. zm.). Zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego I Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr biotech. Magdaleny Sochy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. n. med. Marzena Gajęcka

Poznań, 27 kwietnia 2018 r.

Katedra i Zakład Genetyki i Mikrobiologii  
Farmaceutycznej  
Uniwersytetu Medycznego  
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu  
ul. Święcickiego 4, 60-781 Poznań  
tel. (61) 854 6721  
mail: [gamar@man.poznan.pl](mailto:gamar@man.poznan.pl)

Instytut Genetyki Człowieka  
Polskiej Akademii Nauk  
ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań  
tel. (61) 6579-160