



## O C E N A

### Rozprawy na stopień doktora nauk medycznych

Mgr biologii, mgr biotechnologii Damiana Krzysztofa Bednarczyka

### *”Znaczenie rearanżacji wybranych genów wczesnej embriogenezy w etiopatogenezie wrodzonego zarośnięcia przetyku”*

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Maria Małgorzata Sasiadek

Zgodnie z uchwałą Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu podjętą 20 lutego 2014 roku o powołaniu mnie na recenzenta wyżej wymienionej rozprawy w związku z ubieganiem się mgr biologii, magistra biotechnologii Damiana Krzysztofa Bednarczyka o stopień naukowy doktora nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna, mam zaszczyt przedstawić poniższą opinię.

Przedłożona do oceny praca obejmuje 132 (113) strony tekstu w układzie klasycznym z zachowaniem odpowiednich proporcji, w tym: Wstęp (22 strony), Cel pracy (1 strona), Materiał (1 strona), Metody (30 stron), Wyniki (23 strony), Dyskusja (30 stron), Wnioski (1 strona); streszczenie w języku polskim (2 strony) umieszczone jako załącznik. Rozprawa poprzedzona jest spisem treści (3 strony). W pracy zamieszczono 43 ryciny oraz 9 tabel (tabele bez numeracji w rozdziale Metody). Piśmiennictwo zawiera 120 pozycji, w znakomitej większości anglojęzycznych, wśród których ponad połowę stanowią publikacje z ostatniego dziesięciolecia. Ponadto, w rozdziale Załączniki przedstawione zostało źródło finansowania (grant NCN) oraz nota biograficzna Doktoranta i spis jego publikacji.

Oceniając przedłożoną mi rozprawę na stopień doktora nauk medycznych, dokonam jej charakterystyki w zakresie:

1. wartości celu badawczego
2. poprawności metodycznej
3. znaczenia naukowego, klinicznego i praktycznego wniosków wynikających z przeprowadzonych analiz.
4. redakcji przedłożonej pracy.

## 1. Wartość celu badawczego

Wstęp do rozprawy poprzedzony został przedstawianiem definicji i ogólnych informacji na temat wrodzonych wad rozwojowych oraz znaczenia narodowych i ponadnarodowych rejestrów, które stanowią podstawę do badań epidemiologicznych, opracowań naukowych oraz umożliwiają monitorowanie udziału czynników teratogennych w postawaniu wad.

Wrodzone zarośnięcie przełyku występuje w populacjach europejskich ze średnią częstością 2.43 na 10000 urodzeń (różnice w częstości regionalnej 1.27 – 4.55) [Pedersen i wsp., *Arch Dis Child* 2012]. Wada ta może być izolowana (~45% przypadków), skojarzona luźno z innymi wadami (~31%) lub stanowić element znanych asocjacji lub zespołów wad (~24%), w których udział czynników genetycznych jest znany lub intensywnie poszukiwany.

W powszechnym użyciu jest klasyfikacja anatomiczna z licznymi typami i podtypami wad, która nie koreluje ze zidentyfikowanymi dotychczas zmianami genetycznymi. Poza określonymi zespołami wad, które mogą być uwarunkowane dużymi lub submikroskopowymi aberracjami chromosomowymi bądź monogenowo, większość przypadków występuje sporadycznie, a za ich najbardziej prawdopodobne podłoże uznaje się wieloczynnikowe współdziałanie czynników środowiskowych i genetycznych. W dalszej części wstępu Doktorant przedstawił morfogenezę przełyku i tchawicy oraz dotychczas poznane mechanizmy molekularne, w tym udział genów wczesnej embriogenezy takich jak m.in. grupa genów homeotycznych (*Hox*), genów należących do szlaków sygnalizacyjnych (*Shh*, *Gli*) oraz kilku innych, których udział w rozwoju tych narządów badano na eksperymentalnych modelach zwierzęcych. Autor omawia wyniki prac epidemiologicznych wskazujące wpływ środowiskowych czynników ryzyka na ujawnienie się wady, głównie jednak w postaci zespołu wad, a nie formy izolowanej.

Nadal jednak wiedza na temat etiologii zarośnięcia przełyku jest fragmentaryczna, a w odpowiednikach szeregu genów znanych z badań eksperymentalnych na zwierzętach nie zaleziono na razie mutacji u człowieka. Ten tok rozumowania stał się przesłanką do wyboru tematu pracy, który uważam za trafny i ważny, a w konsekwencji także do sformułowania poznawczego celu pracy, którym była:

- analiza mutacyjna i detekcja liczby kopii wybranych genów u pacjentów z zarośnięciem przełyku, których produkty biorą udział we wczesnej embriogenezie, a których udział w etiologii wrodzonego zarośnięcia przełyku wykazany został na eksperymentalnym modelu zwierzęcym.

## 2. Poprawność metodyczna

### 2.1 Materiał i metody

Badaniami objęta została grupa 97 noworodków oraz dzieci z zarośnięciem przełyku. Wstępny podział dokonany został przez genetyka klinicznego, który na podstawie wywiadu, badania przedmiotowego oraz oceny fenotypu wyodrębnił 2 grupy pacjentów:

1. pacjenci z izolowaną formą zarośnięcia przełyku,
2. pacjenci z zespołową formą zarośnięcia przełyku (tj. ze współwystępującymi dodatkowymi wadami rozwojowymi i/lub dysmorfia oraz opóźnieniem rozwoju psychoruchowego i/lub niepełnosprawnością intelektualną (NI).

Rekrutacja pacjentów odbywała się poprzez Poradnię Genetyczną Fundacji Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, gdzie u pacjentów z zespołową formą zarośnięcia przełyku zlecono wykonanie badań cytogenetycznych w celu wykluczenia aberracji liczbowych i strukturalnych chromosomów.

Materiał do dalszych (?) badań stanowiło DNA wyizolowane z limfocytów krwi obwodowej 97 pacjentów oraz DNA wyizolowane z tkanki przełyku pobranej podczas zabiegu operacyjnego (4 próbki).

Grupę kontrolną oraz materiał referencyjny stanowiły próbki DNA wyizolowanego z krwi obwodowej 50 zdrowych osób.

Doktorant dokładnie opisał metodykę badawczą, poczynając od wstępnych etapów przygotowawczych (izolacja DNA i reakcja łańcuchowa polimerazy – PCR). W realizacji założeń projektu Autor wykorzystywał szersze spektrum technik molekularnych, w tym: elektroforezę w żelu akryl amidowym w warunkach denaturujących z gradientem temperatury (TTGE), technikę MLPA (ang. *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) z użyciem zestawów komercyjnych produkcji firmy MRC-Holland (SALSA MLPA kit: P187-B1 Holoprosencephaly; P179 Limb malformations-1, P067-A2 PTCH1/Gorlin, P062 LDLR), sekwencjonowanie (na sekwenatorze kapilarnym ABI Prism 310 Genetic Analyser®) oraz metodę ilościowej reakcji PCR z detekcją w czasie rzeczywistym (RT-qPCR) z podaniem wykazu stosowanych sond TagMan® dla 12 genów.

Doktorant uzyskał zgodę Komisji Bioetycznej na przeprowadzenie badań, które były finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach grantu promotorskiego (nr 5349/B/P01/2011/40)

**Podsumowanie:** Doktorant wykazał się wysokimi umiejętnościami wykorzystania w pracy laboratoryjnej metod genetyki molekularnej. Grupa badana niestety została opisana niezbyt precyzyjnie. Autor podaje, że grupa badana liczyła 97 osób, ale nie uściśla, czy ta liczba dotyczy pacjentów po wykluczeniu aberracji chromosomowych, czy wszystkich wstępnie zakwalifikowanych? Czy pacjenci, u których wykryto duże zmiany chromosomowe zostali także poddani badaniom molekularnym? Nie można także zorientować się, jaka była liczebność badanych podgrup pacjentów, tj. z izolowaną wadą zarośnięcia przełyku lub zespołową formą wady/dysmorfia/NI.

## 2.2 Wyniki

Wyniki zostały przedstawione w postaci 23 rycin uzupełnionych krótkimi komentarzami Autora.

Doktorant konsekwentnie pominął uściślenie liczebności badanych podgrup, tj. z izolowanym zarośnięciem przełyku i z zespołową formą wady, itd. (informacji tych trzeba było szukać ‘pomiędzy wierszami’).

W materiale DNA wyizolowanym z krwi pacjentów Autor wymienia wykryte zmiany w postaci:

- heterozygotycznej mutacji synonimicznej w genie *SHH*, opisanej wcześniej – u 2 pacjentów i dotychczas nie opisanej – u 1 z 97 badanych pacjentów,
- heterozygotycznej mutacji w sekwencji regulatorowej genu *SHH-ZRS* u 11 z 97 (11%) badanych pacjentów,
- delecji eksonu 2. genu *PTCHI* – u 2 z 81 pacjentów,
- amplifikacji eksonu 3. genu *NKX2-1* – u 6 z 28 pacjentów z izolowaną wadą przełyku,
- delecji eksonu 1. genu *FOXF1* – u 5 z 28 z izolowaną wadą przełyku.

Jedynie w przypadku zmian wykrytych w genie *NKX2-1* oraz genie *FOXF1* Autor sprecyzował, że zidentyfikował je u pacjentów z izolowaną postacią zarośnięcia przełyku. Wszystkie pozostałe znalezione warianty podawane są w odniesieniu do całej grupy badanej (bez uściślenia, ilu pacjentów miało izolowaną, a ilu zespołową postać zarośnięcia przełyku).

Interesujące jest wykrycie przy pomocy zestawu MLPA P179 delecji w regionie 19p13 w tkance wyizolowanej z przełyku jednego pacjenta (? – brak precyzyjnej informacji). Po dokładnej analizie miejsca hybrydyzacji sond ustalono, że delecją objęty jest zlokalizowany w tym regionie gen *LDLR*. Obecność zmiany potwierdzono innym zestawem MLPA, P062 *LDLR*, zawierającym sondy dla wszystkich eksonów genu *LDLR* oraz dwie sondy flankujące w genach sąsiadujących. Pozwoliło to na ustalenie delecji całego genu *LDLR* w DNA wyizolowanym z tkanki przełyku oraz na wykluczenie delecji w limfocytach z krwi obwodowej. Weryfikacja wyników uzyskanych metodą MLPA przeprowadzona metodą RT-qPCR potwierdziła delecję genu *LDLR* w materiale pochodzącym z przełyku. Badanie rozszerzone o analizę metodą genomowej hybrydyzacji porównawczej (ang. *Comparative Genomic Hybridisation*; CGH) potwierdziło obecność ww. delecji zlokalizowanej w regionie chromosomu 19p13 i wykazało ponadto delecje w kilku innych regionach (7q11.1-7q11.2, 16p11.2-16p12 oraz 16q12.1). Żadnej z tych delecji nie znaleziono w DNA wyizolowanym z krwi pacjenta.

Badania metodą MLPA zmierzające do ustalenia liczby kopii genów *SHH*, *GLI2*, *GLI3* oraz *PTCHI* nie wykazały zmian u żadnego z analizowanych pacjentów; wyniki badań wskazujące na amplifikację oraz delecję eksonu 10. genu *GLI3*, odpowiednio u 2 i 5 pacjentów zostały zweryfikowane negatywnie metodą sekwencjonowania.

Analiza metodą RT-qPCR nie wykazała także zmian liczby kopii sekwencji regulatorowej *ZRS* genu *SHH* oraz genów *HOXC4*, *RAR $\alpha$* , *RAR $\beta$* , *SOX2* oraz *NOG*.

**Podsumowanie:** Autor rozprawy dokładnie opisał uzyskane wyniki. Znacznie łatwiej byłoby je śledzić gdyby wszystkie zidentyfikowane zmiany podsumowane zostały w tabeli z podaniem fenotypu pacjenta (wada izolowana / zespołowa/itd.), zapisu mutacji / wariantu oraz klasyfikacji charakteru zmiany (nowa prawdopodobnie patogenna, nowa o niejednoznacznie ustalonej patogenności, wariant polimorficzny) w porównaniu w danymi w kilku, z wielu dostępnych, bazach bioinformatycznych.

### **3. Wartość naukowa, kliniczna i praktyczna wniosków wynikających z przeprowadzonych analiz.**

Badania przeprowadzone w grupie 97 pacjentów z wadami przełyku w postaci izolowanej lub zespołowej pozwoliły Doktorantowi na zrealizowanie założonego celu oraz sformułowanie czterech wniosków:

- zmiany liczby kopii analizowanych regionów badanych genów (*SHH*, *ZRS-SHH*, *GLI2*, *GLI3*, *HOXC4*, *RAR $\alpha$* , *RAR $\beta$* , *SOX2* i *NOG*) [najprawdopodobniej] nie stanowią istotnego czynnika ryzyka wystąpienia wrodzonego zarośnięcia przełyku,
- w świetle danych z piśmiennictwa zidentyfikowane warianty molekularne genu *SHH* oraz zmiany liczby kopii w genach *PTCHI*, *NKX2-1* i *FOXF1* mogą mieć charakter polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) lub polimorfizmów liczby kopii (CNV),
- wyniki przeprowadzonych badań oraz analiza piśmiennictwa potwierdzają heterogenność etiologii zarośnięcia przełyku i zróżnicowanie pomiędzy pacjentami.

Jednocześnie technika MLPA umożliwiła przypadkowe wykrycie delecji w regionie 19p13 w tkance pochodzącej z przełyku ('wypadnięcie' sond kontrolnych dla zestawu P179) a nieobecnej w germinálním DNA. Zastosowanie metody porównawczej hybrydyzacji genomowej (przy współpracy z innym ośrodkiem) pozwoliło Autorowi na wytypowanie LDDR, który uległ delecji wraz z dwoma genami flankującymi, jako potencjalnego czynnika związanego z etiologią wrodzonego zarośnięcia przełyku.

W dyskusji Autor krytycznie odniósł się do zalet i ograniczeń metody TTGE, uwypuklając z jednej strony jej przydatność do szybkiej, przesiewowej identyfikacji zmian jakościowych w genomie, ale zwracając także uwagę na czułość metody w oscylującą w granicach 80-90% dla fragmentów o długości do 300 par zasad i obniżającą się wraz ze wzrostem liczby analizowanych nukleotydów. Pełna analiza wytypowanych genów wymaga zastosowania także innych metod, m.in. sekwencjonowania.

Badania liczby kopii wybranych genów prowadzone były przy użyciu sond komercyjnych, które obejmują tylko wytypowane fragmenty. Nie można zatem wykluczyć hipotetycznych zmian w regionach nie objętych sondami. Pełny obraz można by uzyskać dopiero przy zastosowaniu odpowiednich mikromacierzy, a-CGH i a-SNP.

**Podsumowanie:** Wyniki uzyskane w trakcie realizacji projektu stanowią wkład Autora w poszerzenie wiedzy na temat patogenezy zarośnięcia przełyku. Niewątpliwie stać się mogą także inspiracją do dalszych badań naukowych zmierzających do wyjaśnienia patogenności niektórych zidentyfikowanych genów/*loci* oraz kolejnych publikacji.

#### 4. Redakcja przedłożonej pracy

Wykorzystane w prezentacji wyników liczne ryciny stanowią wartościowy element dokumentacji naukowo-badawczej i ułatwiają śledzenie opisów tekstowych.

Mam kilka uwag o charakterze redakcyjnym do ew. wykorzystania podczas przygotowania wyników do kolejnych publikacji.

Warto było zacząć od przedstawienia hipotezy „0”, np., że mutacje w genach wytypowanych na podstawie eksperymentów na modelach zwierzęcych: *Hoxc4*, *Rara*, *Rarb*, *Sox2*, *Nog*, *Foxf1*, *Nkx2-1*, *Shh*, *Gli2* oraz *Gli3* mogą mieć udział w patogenezie zarośnięcia przełyku, a następnie sformułować szczegółowe cele dla weryfikacji tej hipotezy, takie jak: (1) – przeprowadzenie analizy mutacji genu *SHH* i jego sekwencji regulatorowej *ZRS*, (2) – określenie liczby kopii następujących *loci*: *SHH*, *ZRS-SHH*, *GLI2*, *GLI3*, *PTCHI*, *HOXC4*, *RARa*, *RARβ*, *SOX2*, *NOG*, *FOXF1* i *NKX2-1*. Takie sformułowania pojawiły się dopiero w streszczeniu.

##### Rozdział Materiał i metody

Brak dokładnego opisanie grupy badanej, z wyróżnieniem podgrupy pacjentów z izolowanym zarośnięciem przełyku oraz podgrupy z zarośnięciem przełyku z towarzyszącymi innymi wadami/NI/dysmorfia. Nie potrafiłam odszukać informacji ilu pacjentów zostało zakwalifikowanych do każdej z podgrup oraz jakie wady występowały w tej drugiej grupie. Warto byłoby także przedstawić, czy wśród badanych pacjentów znaleźli się tacy, u których zostały rozpoznane znane zespoły dymorficzne o etiologii chromosomowej, jednogennej lub wieloczynnikowej.

##### Rozdział Wyniki – 5.4 – Podsumowanie wyników (str. 81-82).

Bardzo brakowało mi tabeli z zestawieniem zidentyfikowanych zmian z fenotypem pacjenta (wada izolowana / zespołowa), zapisem mutacji / wariantu oraz klasyfikacji charakteru zmiany (nowa prawdopodobnie patogenna, nowa o niejednoznacznie ustalonej patogenności, wariant polimorficzny). Odniesienie wyników poszukiwań do co najmniej kilku z wielu dostępnych baz bioinformatycznych (*analiza in silico*) pozwoliłoby w sposób przybliżony określić potencjalną patogenność lub jej brak. Dla przykładu podaję adresy kilku takich baz: Mutation Taster: <http://www.mutationtaster.org/>; PolyPhen-2: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>; PMut: <http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut/>; SIFT: <http://sift.jcvi.org/>.

Zapisy wariantów molekularnych powinny być ujednolicone: zapis tej samej zmiany na str. 60. przedstawiony został jako mRNA pozycja 721G>A, a na stronie 81. jako NM\_000193.2:c.570G>A. Rekomendowałabym konsekwentne stosowanie zapisu w systemie CDS, w którym liczenie rozpoczyna się zawsze w tym samym punkcie, co zapobiega rozbieżnościom i ułatwia porównywanie.

W podsumowaniu wyników: pkt. 1. i 2. zwracam uwagę na pomyłki w zapisie niektórych wariantów: sekwencje kodujące zawsze rozpoczynają się małą literą c. a nie g., podobny kod stosuje się dla opisu transkryptu. Bezpieczniej jest także stosować nomenklaturę rekomendowaną przez HGVS (Human Genome Variation Society) <http://www.HGVS.org/mutnomen/>, wg której termin mutacja zastrzega się dla zmian patogennych; w innych przypadkach proponuje się raczej 'wariant molekularny'. Baza NCBI zawiera wszystkie warianty, z których część może okazać się wariantami polimorficznymi a nie mutacjami.

Streszczenie chyba pomyłkowo zostało umieszczone jako Załącznik, bo powinno być końcową częścią rozprawy. Proponuję także dołączenie streszczenia w języku angielskim.

Tabele w liczbie 9, bez numeracji, znajdowały się tylko w rozdziale Materiał i Metody – spis tabel i rycin byłby pomocny.

Powyższe uwagi nie obniżają wartości i nie powinny wpłynąć na ogólną ocenę pracy, która, co chcę podkreślić, została starannie napisana i zilustrowana odpowiednimi rycinami.

#### WNIOSKI KOŃCOWE

Uwzględniając w ocenie merytoryczną i poznawczą wartość przedstawionej pracy, umiejętności Doktoranta w zakresie pracy laboratoryjnej oraz przeprowadzenia krytycznej oceny uzyskanych wyników i wnikliwej dyskusji z wykorzystaniem odpowiedniego piśmiennictwa uważam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy o Stopniach Naukowych i Tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595, z późn. zm.).

Doktorant jest także autorem lub współautorem 5 pełnotekstowych publikacji oraz około 10 doniesień na konferencjach; trzy prace są przygotowane do publikacji.

Na tej podstawie zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu z wnioskiem o dopuszczenie mgr biologii, mgr biotechnologii Damiana Bednarczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. n. med. Krystyna H. Chrzanowska

Warszawa, 26 maja 2014 r.