



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

KATEDRA I ZAKŁAD GENETYKI MEDYCZNEJ

Kierownik: prof.dr hab.med. Anna Latos-Bieleńska

ul. Rokietnicka 8
60-806Poznań

tel./fax: +48 61 854 76 13
E-mail: alatos@ump.edu.pl

Poznań, 23.10.2014

Szanowna Pani
Prof. dr hab.med. Małgorzata Sobieszcańska
Dziekan Wydziału Lekarskiego
Uniwersytet Medyczny
ul. J. Mikulicza-Radeckiego 5
50-345 Wrocław

Szanowne Pani Dziekan,

W załączeniu przesyłam pozytywną recenzję rozprawy doktorskiej mgr Damiana Krzysztofa Bednarczyka pt.: „Znaczenie rearanzacji wybranych genów wczesnej embriogenezy w etiopatogenezie wrodzonego zarośnięcia przełyku”.

Z wyrazami szacunku

Anna Latos-Bieleńska
Prof. dr hab.med. Anna Latos-Bieleńska



Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

KATEDRA I ZAKŁAD GENETYKI MEDYCZNEJ

Kierownik: prof.dr hab.med. Anna Latos-Bieleńska

Centrum Biologii Medycznej, ul. Rokietnicka 8, 60-806 Poznań
Tel. 61 8547613 (sekretariat i fax); 61 8547610 (kierownik Katedry)
www.kgm.ump.edu.pl; E-mail: alatos@ump.edu.pl

Poznań, 20.09.2014

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Damiana Krzysztofa Bednarczyka pt.:
„Znaczenie rearanżacji wybranych genów wczesnej embriogenezy w etiopatogenezie wrodzonego zarośnięcia przełyku”

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

Katedra i Zakład Genetyki
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Przystępując do oceny rozprawy doktorskiej mgr Damiana Krzysztofa Bednarczyka chcę podziękować Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu za powierzenie mi tego szaczonego obowiązku. Oceniana przeze mnie rozprawa doktorska mgr Damiana Krzysztofa Bednarczyka bardzo dobrze wpisuje się w prężny rozwój Zespołu Pani Profesor Marii Małgorzaty Sząsiadek, a temat rozprawy doktorskiej dotyczący molekularnych mechanizmów, jakie leżą u podłoża wad wrodzonych u człowieka, są bardzo bliskie moim osobistym zainteresowaniom naukowym.

Z noty biograficznej wynika, że mgr Damian Krzysztof Bednarczyk od pierwszych etapów edukacji szkolnej przejawiał duże zdolności poznawcze i odnosił sukcesy. Ukończył dwa kierunki studiów na Uniwersytecie Wrocławskim (biologię ze specjalnością mikrobiologia oraz biotechnologię ze specjalnością biologia molekularna). Po studiach przebywał na rocznym stażu w Instytucie Biologii Rozwoju i Nowotworów Centrum Biochemicznego Uniwersytetu w Nicei, we Francji. Od 2008 roku związany jest z Katedrą i Zakładem Genetyki UM we Wrocławiu, gdzie wykonał swoją pracę doktorską. Doktorant jest już autorem 7 prac pełnotekstowych w czasopiśmie zagranicznych i krajowych (3 następne w przygotowaniu) oraz blisko 10 doniesień na zjazdach i konferencjach naukowych w kraju i zagranicą. Całość CV świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu mgr Damiana Krzysztofa Bednarczyka do podjęcia badań i dojrzałości naukowej na obecnym etapie finalizacji przewodu doktorskiego.

Projekt badawczy był realizowany w ramach grantu promotorskiego NCN.

Praca doktorska mgr Damiana Krzysztofa Bednarczyka ma układ typowy dla rozpraw doktorskich w dziedzinie nauk biologicznych i medycznych. Praca liczy 139 stron, w tym 22 strony stanowi „Wstęp”, 1 stronę „Cel pracy”, 1 stronę „Materiał”, 30 stron „Metody”, 23 strony „Wyniki”, 30 stron „Dyskusja”, 1 strona „Wnioski”, 19 stron „Piśmiennictwo”. Praca zawiera także „Załączniki”: Informacja o źródłach finansowania, Streszczenie, Nota biograficzna oraz Wykaz publikacji i doniesień konferencyjnych Autora rozprawy doktorskiej. Proporcja między poszczególnymi częściami rozprawy doktorskiej jest właściwa.

Przystępując do oceny merytorycznej, chcę na wstępie odnieść się do tematu rozprawy doktorskiej. Wady wrodzone dotyczą 2-3% noworodków i nie jest to mało, zważywszy poważne skutki zdrowotne i społeczne. Urodzenie dziecka z wadą/wadami jest jedną z najważniejszych przyczyn zgłoszenia się rodziny do poradni genetycznej, a jednocześnie świadomość znaczenia czynników genetycznych w etiologii wad wrodzonych jest w społeczeństwie i wśród lekarzy niegenetyków ciągle jeszcze niewystarczająca. Jedną z przyczyn jest niedostateczne poznanie etiologii wad wrodzonych. Badanie podłoża molekularnego wad wrodzonych napotyka – mimo ogólnego znacznego, wręcz spektakularnego, postępu w genetyce - na duże bariery, gdyż embriogeneza zachodzi w pierwszych tygodniach po zapłodnieniu i nie ma dostatecznego wglądu w rozwój zarodka i płodu w krytycznej dla powstania danej wady fazie. Stąd wielka popularność modeli zwierzęcych. W badaniu podłoża molekularnego wad wrodzonych interesujące są zarówno mechanizmy dziedziczne, kiedy mutacja znajduje się w każdej komórce ciała rozwijającego się dziecka i można ją przekazać następnym pokoleniom, jak również genetyczne mechanizmy niedziedziczne, ograniczone do komórek somatycznych i uczestniczące w powstaniu wady u danego dziecka. Poznanie podłoża molekularnego to pierwszy etap na drodze do podjęcia działań profilaktycznych i do właściwego poradnictwa genetycznego. Podejmowanie badań mających na celu poznanie genetycznych mechanizmów zaburzonej embriogenezy jest zatem w pełni uzasadnione.

Wadą rozwojową, której podłoże molekularne mgr Bednarczyk badał, było wrodzone zarośnięcie przełyku – wada ciężka, obserwowana w określonych zespołach wad, także izolowana, bez towarzyszących wad wrodzonych. W tym miejscu należy zwrócić uwagę, że etiologia tej wady jest słabo poznana.

We Wstępie Autor opisuje klasyfikację anatomiczną wady i morfogenezę przełyku i tchawicy (w tym miejscu dobrze byłoby umieścić odpowiednie ryciny), eksperymentalne modele zwierzęce, w których wadę wywoływało wyłączenie określonych genów, znaczenie czynników środowiskowych w powstawaniu tej wady oraz aktualny stan wiedzy na temat podłoża molekularnego zarośnięcia przełyku (jest to szczególnie interesująca i najobszerniejsza część Wstępu). Wstęp wskazuje na szeroką znajomość piśmiennictwa i bardzo dobre przygotowanie Doktoranta do podjęcia badań.

Celem pracy doktorskiej była „analiza mutacyjna i detekcja liczby kopii wybranych genów, których produkty biorą udział we wczesnej embriogenezie, a których udział w

etiologii wrodzonego zarośnięcia przełyku wykazany został na eksperymentalnym modelu zwierzęcym, u pacjentów z zarośnięciem przełyku”. Cel pracy został zrealizowany.

Mgr Bednarczyk objął badaniami 97 noworodków i dzieci z zarośnięciem przełyku. Biorąc pod uwagę częstość występowania tej wady (1/4100 urodzeń), jest to grupa stosunkowo duża, odpowiadająca liczbie dzieci z zarośnięciem przełyku rodzących się na terenie Polski w ciągu całego roku. W 4 przypadkach Doktorant uzyskał do badań genetycznych także tkankę przełyku pobraną podczas zabiegu operacyjnego.

Na podstawie danych w piśmiennictwa, zwłaszcza wyników badań na modelach zwierzęcych, Doktorant umiejętnie wytypował geny, które były dobrymi kandydatami jako geny, których mutacje punktowe lub zmiana dawki mogą mieć związek z zarośnięciem przełyku.

Analiza zastosowanych metod nasuwa pewne uwagi. Autor zastosował MLPA, metodę ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy z detekcją w czasie rzeczywistym oraz elektroforezę w żelu akrylamidowym w warunkach denaturujących z gradientem temperatury (TTGE), a w jednym przypadku CGH. Gen *SHH* i jego sekwencję regulatorową *ZRS* Doktorant badał w kierunku obecności mutacji punktowych stosując metodę TTGE. Jest to metoda przesiewowa, mniej dokładna niż PCR i sekwencjonowanie, zachodzi zatem pytanie, czy nie lepiej byłoby zastosować właśnie sekwencjonowanie, zapewne zadecydowałyby względy finansowe. Duża część badań dotyczyła określenia liczby kopii wybranych loci (*SHH*, *GLI2*, *GLI3*, *PTCH1*, *HOXC4*, *RARalfa*, *RARbeta*, *SOX2*, *NOG*, *NKX2-1*, *FOXF1* i sekwencji regulatorowej *ZRX*). Doktorant zastosował MLPA oraz RT-qPCR.

Oceniając metody należy pamiętać, że koncepcja pracy doktorskiej w tym kształcie powstała kilka lat temu i wówczas było to uzasadnione i najbardziej racjonalne podejście – aby możliwie najtaniej przeanalizować jak największą liczbę genów mogących mieć związek przyczynowy z zaburzoną morfogenezą. Dzisiaj podejście metodyczne do badania podłoża molekularnego zarośnięcia przełyku byłoby inne i oczekuję, że podczas publicznej obrony rozprawy doktorskiej Doktorant przedstawi swój pogląd na obecnie najbardziej racjonalne podejście metodyczne w badaniu podłoża molekularnego wad wrodzonych.

Doktorant uzyskał interesujące wyniki badań. W genie *SHH* znalazł u 3 pacjentów mutacje synonimiczne – dwie opisane już w bazie danych NCBI i jedną wcześniej nieznaną. Zgadzam się z Doktorantem, który w Dyskusji pisze, że nie można przesądzać o braku ich znaczenia klinicznego i umiejętnie to uzasadnia. U 11 pacjentów Doktorant wykrył mutację w obrębie sekwencji regulatorowej *ZRS* genu *SHH*. Doktorant nie wykazał zmiany liczby kopii genu *SHH* i jego sekwencji regulatorowej *ZRS* oraz liczby kopii genów *GLI2*, *GLI3*, *HOXC4*, *RARalfa*, *RARbeta*, *SOX2*, *NOG*. Autor stwierdził delecję eksonu 2. genu *PTCH1* u dwóch pacjentów, amplifikację eksonu 3. genu *NKX2-1* u sześciu pacjentów oraz delecję eksonu 1. genu *FOXF1* u pięciu pacjentów.

Szczególnie interesującym i wartościowym naukowo wynikiem jest stwierdzenie aberracji chromosomowych, w tym delecji 19p13 w materiale genetycznym wyizolowanym z tkanki przełyku. Mutacja ta była nieobecna w limfocytach. Odkrycie to wskazuje na nieopisany dotąd mechanizm powstawania wad rozwojowych przełyku i tchawicy, w którym do zaburzeń morfogenezy dochodzi wskutek lokalnych zmian genetycznych. Jest to ważne,

oryginalne odkrycie naukowe, które rzuca światło na ogólne mechanizmy zaburzeń morfogenezy.

Dyskusja jest wyróżniającą się częścią rozprawy doktorskiej. Jest dojrzała i ostrożna, wskazuje na bardzo dobrą znajomość piśmiennictwa, nie tylko dotyczącego zarośnięcia przełyku i metod, ale również dobrej ogólnej znajomości aktualnej genetyki molekularnej.

Pracę kończą 4 wnioski, ostrożnie sformułowane i uprawnione. Mgr Bednarczyk stwierdza, że 1. Zmiany liczby kopii analizowanych regionów *loci*: *SHH*, *ZRS-SHH*, *GLI2*, *GLI3*, *HOXC4*, *RARalfa*, *RARbeta*, *SOX2* i *NOG* nie stanowią istotnego czynnika ryzyka wystąpienia wrodzonego zarośnięcia przełyku; 2. Ustalenie znaczenia klinicznego mutacji synonimicznych w genie *SHH* oraz zmian liczby kopii obserwowanych w genach *PTCH1*, *NKX2-1* oraz *FOXF1* wymaga dalszych badań; 3. Stwierdzone w tkance zarośniętego przełyku lokalne aberracje chromosomowe mogą wskazywać na istnienie nieopisanego dotąd w piśmiennictwie mechanizmu powstawania wad rozwojowych przełyku i tchawicy; 4. Etiologia zarośnięcia przełyku jest heterogenna.

Piśmiennictwo liczy 120 pozycji, jest bardzo dobrze dobrane.

Z obowiązku recenzenta zwracam także uwagę drobne błędy, które nie obniżają oceny merytorycznej pracy.

- Warto byłoby na początku pracy umieścić spis skrótów stosowanych w pracy.
- Nie znalazłam streszczenia w języku angielskim.
- Brak informacji o zgodzie Komisji Bioetycznej, chociaż jest oczywistą sprawą, że Autor ją miał.
- Autor pisze, że zmiany genetyczne opisane dotąd u pacjentów z zespołową formą zarośnięcia przełyku można podzielić na dwie grupy: „aberracje chromosomowe oraz mutacje pojedynczych nukleotydów” (str. 6, 21) – powinno być raczej „aberracje chromosomowe i mutacje w pojedynczych genach”.
- Str. 21, wiersz 12-13 od dołu – skrót myślowy, „Do tej pory opisano co najmniej kilkadziesiąt aberracji w liczbie lub strukturze chromosomów” – brakuje „u osób z zarośnięciem przełyku”.
- Str. 29 – tytuł rozdziału „Materiał”, lepiej byłoby „Pacjenci”, ponieważ Autor pisze „Badaniami zostało objętych 97 noworodków oraz dzieci z zarośnięciem przełyku”.
- Str. 29 i in. – DNA jest rodzaju męskiego (ten kwas).
- We Wstępie w niektórych miejscach brakuje umieszczenia cytowania.

Wyniki pracy zostały przez Doktoranta częściowo opublikowane, w przygotowaniu są kolejne publikacje, w których mgr Bednarczyk jest pierwszym autorem.

Reasumując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Damiana Krzysztofa Bednarczyka dotyczy interesującego naukowo i ważnego problemu molekularnych mechanizmów będących u podłoża wrodzonego zarośnięcia przełyku i pokazuje jeden z

ogólnych mechanizmów prowadzących do zaburzeń embriogenezy (lokalne zmiany genetyczne), co jest ważnym odkryciem naukowym. Praca spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim – w tym wypadku na stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej. Z całym przekonaniem zwracam się zatem do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie mgr Damiana Krzysztofa Bednarczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof.dr hab.med. Anna Latos-Bieleńska
Kierownik Katedry i Zakładu Genetyki
Medycznej UM w Poznaniu