

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Pelc  
pt.: „Identyfikacja mutacji w genach szlaku sygnałowego Ras/MAPK i analiza ich korelacji  
z fenotypem zespołów: Noonan, sercowo-twarzowo-skórnego oraz Costello”,  
w związku z powierzeniem obowiązków recenzenta przez  
Radę Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Praca doktorska została przygotowana w Zakładzie Genetyki Medycznej Instytutu „Pomnik - Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Małgorzaty Krajewskiej-Walasek. Promotorem pomocniczym rozprawy była dr n. med. Elżbieta Ciara. Praca została przygotowana w formie manuskryptu zalecanego dla prac promocyjnych. Recenzent uznaje niniejszą rozprawę jako bardzo dobrą z uwagą, że praca jest bardzo rozległa, liczy bowiem 441 stron, co na pewno nie ułatwiło wykonania recenzji.

Rozprawę rozpoczyna wykaz **Stosowanych skrótów** liczący osiem stron. Jest to ważna część rozprawy, ponieważ wprowadzone skróty umożliwiają sprawniejsze poruszanie się po rozprawie. W **Celu pracy** liczącym dwie strony, Autorka informuje o realizacji projektów badawczych, które przyczyniły się do uzyskania ciekawych wyników, a jako cel główny podaje charakterystykę kliniczną i molekularną zespołów z grupy RASopatii: Noonan (NS), sercowo-twarzowo-skórnego (CFCS), Costello (CS) i zespołów pokrewnych oraz wdrożenie diagnostyki genetycznej tych chorób w Polsce. Autorka przedstawiła także sześć celów szczegółowych, dotyczących ustalenia podłoża molekularnego RASopatii i udziału całego szeregu genów w ich patogenezie. Cele uważam za ambitne, trudne do realizacji ze względu na występowanie różnych wariantów genów warunkujących badane zespoły.

We **Wstępie** rozprawy liczącym 69 stron, Autorka skupia się głównie na szlakach transdukcji sygnału, w których uczestniczą receptory powierzchniowe komórki i zostaje uruchomiona kaskada białek efektorowych. Należą do nich kinazy białkowe aktywowane mitogenami z rodziny MAPK. Wśród tych szlaków MAPK jest szlakiem kinaz białkowych aktywowanych mitogenami za pośrednictwem białek Ras. Transdukcja przez szlak Ras/MAPK odbywa się u człowieka wewnątrzkomórkowo i międzykomórkowo. Autorka starała się przyswoić czytelnikowi jak najlepiej szlak transdukcji sygnału Ras/MAPK i przygotowała ryciny i tabele, w których przedstawia charakterystykę molekularną, biochemiczną i proteomiczną składników szlaku Ras/MAPK związanych z RASopatiami. Następnie przechodzi do opisu zespołów z grupy RASopatii i przedstawia geny warunkujące wystąpienie RASopatii.

Ze względu na podobieństwo kliniczne zespołów NS, CFCS i CS, diagnostyka różnicowa tych chorób sprawia znaczne trudności ze względu na liczne cechy fenotypowe zmieniające się wraz z wiekiem pacjentów. Kolejną ważną sprawą poruszaną we wstępie jest opis podłoża molekularnego oraz zależności między genotypem a fenotypem w RASopatiach ze szczególnym uwzględnieniem podłoża molekularnego zespołów Noonan i Noonan-Like. W końcowej części Wstępu, Autorka przybliżyła nowe sposoby badań molekularnych przyczyniające się do szczegółowej charakterystyki RASopatii. Wstęp, wprawdzie bardzo rozległy, uważam za bardzo pomocny w zrozumieniu RASopatii i pokrywania się w dużej mierze z proponowanymi przez Autorkę rozwiązaniami złożonych kwestii dotyczących RASopatii. Wygląda na to, że Autorka celowo przedstawiła najważniejsze aspekty swojej rozprawy, które w dalszych częściach ulegają rozwiązaniu, z zachowaniem kolejności ich przedstawienia. Wstęp oceniam jako bardzo dobry.

**Materiały** zostały przedstawione na 17 stronach. Autorka charakteryzuje materiał biologiczny i grupę badaną, stosowaną aparaturę, bufory i roztwory do izolacji DNA genomowego, reakcji PCR, elektroforezy czy oczyszczania produktów reakcji PCR. Wymienione są również wzorce wielkości fragmentów DNA, stosowane enzymy, zestawy do MLPA, aCGH czy sekwencjonowania nowej generacji oraz sekwencjonowania Sangera. Uwzględniono również stosowane startery.

W rozdziale **Metody**, na 29 stronach przedstawia izolację preparatów genomowego DNA z leukocytów krwi obwodowej, reakcję amplifikacji DNA, reakcję amplifikacji fragmentów poszczególnych genów z udziałem znakowanych fluorescencyjnie dideoksynukleotydów terminacyjnych, analizę elektroforetyczną produktów PCR w żelu agarozowym, oczyszczanie produktów reakcji PCR, rozdzielczą elektroforezę kapilarną znakowanych fluorescencyjnie fragmentów DNA (sekwencjonowanie metodą wg Sangera). Opisuje ponadto analizę MLPA, zastosowanie mikromacierzy całogenomowych, sekwencjonowanie nowej generacji (NGS). Wymienia programy stosowane do analiz molekularnych i bazy danych genetycznych oraz stosowane metody statystycznej analizy danych klinicznych. Kandydatka wyróżniła w rozprawie odrębne rozdziały poświęcone materiałom i metodom. Często w rozprawach obydwie części występują razem, ale ich odrębne ujęcie nie przeszkadza. Na uwagę zasługuje bardzo drobiazgowo przedstawienie wszystkich materiałów i metod, co nie ułatwia czytania, ale nadaje rozprawie dużej szczegółowości, która w sumie jest przydatna do zapoznania się ze wszystkimi procedurami. Można by dyskutować czy nie ma nadmiaru informacji, co na pewno występuje, ale z drugiej strony wskazuje jak szczegółowo Autorka musiała się zagłębić w poszczególne procedury, aby były wykonane i

powtórzone z należytą dokładnością. Jak można było przewidzieć, rozdział Metody kończy się omówieniem nowoczesnych technik sekwencjonowania genomowego i eksomowego.

Rozdział **Wyniki** liczy 43 strony. Jako pierwsze wykonano badania za pomocą sekwencjonowania metodą Sangera. Ustalono podłoże choroby u 90 chorych z podejrzeniem RASopatii. Badania poprzez sekwencjonowanie kontynuowano z zastosowaniem sekwencjonowania nowej generacji (NGS). Od roku 2014 przebadano 49 pacjentów. U dwóch pacjentów badanych z użyciem 1000 genów nie wytypowano genów korelujących z etiologią choroby. Ciekawym rozwiązaniem zastosowanym w pracy było wykorzystanie mikromacierzy całogenomowych (aCGH). U trzech osób analiza aCGH wykazała obecność dużych rearanżacji genomowych. Za pomocą technik sekwencjonowania w grupie 121 polskich pacjentów z potwierdzoną RASopatią zidentyfikowano 74 różne warianty molekularne. W grupie 24 pacjentów z podejrzeniem klinicznym RASopatii przeprowadzono analizę aCGH w celu wykluczenia obecności dużych rearanżacji genomowych. U jednego pacjenta z fenotypem NS zidentyfikowano delecję o wielkości około 6,72 Mbp i 0,54 Mbp powstałych *de novo*. U pozostałych probandów nie zidentyfikowano patogennych niezrównoważonych zmian dawki genomu, większych niż 100 kbp. Autorka stwierdziła, że wykrywalność podłoża RASopatii za pomocą sekwencjonowania Sangera wyniosła około 77%, natomiast zastosowanie metody NGS pozwoliło na ustalenie etiologii choroby na 71%. Ważną informacją jest fakt, że wykrywalność choroby z grupy RASopatii uwarunkowanej defektem w genie ze szlaku Ras/MAPK wyniosła 63%. W sumie w grupie 121 polskich pacjentów z RASopatią zidentyfikowano 74 różne warianty molekularne o patogennym charakterze w 13 genach związanych ze szlakiem Ras/MAPK. Autorka zestawiała wykryte warianty molekularne w tabeli 13. Zdecydowaną większość stanowiły warianty zmiany sensu kodowanego aminokwasu. Ogółem scharakteryzowano 15 nowych wariantów molekularnych nieopisanych w piśmiennictwie i w bazach danych. Bardzo interesująca jest rycina 7, na której Autorka przedstawiła położenie wariantów molekularnych w pięciu genach, w których najczęściej występowały mutacje związane z zespołem NS. Podobnie interesujące zestawienie dotyczy zespołu CFC oraz CS. Recenzent docenia również wykonanie analiz mtDNA w grupie 121 probandów. W końcowej części rozdziału wyniki, Doktorantka określa korelację pomiędzy defektem określonego genu, a objawami klinicznymi badanych zespołów.

Rozdział **Dyskusja** liczy 105 stron i został przygotowany zgodnie z założeniem, aby wszystkie poruszane kwestie znalazły swoje odniesienie w dyskusji. Jest to zgodne z większością rozpraw doktorskich, jednakże w przypadku niniejszej rozprawy, ten rozdział został przygotowany bardzo starannie. Autorka podkreśla, że mutacje w genach kodujących

białka sygnałowe szlaku Ras/MAPK prowadzą do wystąpienia chorób z grupy RASopatii, charakteryzującymi się obecnością wspólnych cech klinicznych, a w niektórych zespołach predyspozycją do rozwoju nowotworów. Dobrze się stało, że Doktorantka podjęła badania z zakresu diagnostyki RASopatii, ponieważ w ten sposób włączyła się do badań o charakterze wyzwania badawczego, w którym uczestniczą ogólnoswiatowe zespoły naukowe. Z dyskusji wynika, że Doktorantka sama jest zadowolona z przeprowadzonych badań i można ją za to pochwalić, ponieważ zastosowane metody wysoce przepustowe umożliwiły wykrycie nowych genów zaangażowanych w etiopatogenezę. Rozdział dyskusja uznaję za dobrze napisany, interesujący, o dużej szczegółowości. Wartościowym elementem tej dyskusji jest porównanie udziału poszczególnych genów szlaku Ras/MAPK etiologii zespołów u polskich pacjentów pediatrycznych w odniesieniu do danych z piśmiennictwa. Takiej oceny dokonała Doktorantka dla zespołu NS, zespołu CFC i zespołu CS, co dobrze przybliży czytelnikowi rozległość prowadzonych badań, szczególnie po zamieszczeniu na rycinach różnego rodzaju genów uczestniczących w patogenezie.

Rozdział **Wnioski** obejmuje sześć stron. W odczuciu Recenzenta jest rozdziałem napisanym kompetentnie, jednakże w formie zbyt rozległej. Autorka we wnioskach starała się opisać całość pracy, lecz ze względu na jej obszerność, zadanie to stało się bardzo trudne. Autorka informuje o scharakteryzowaniu podłoża molekularnego u 120 pacjentów z RASopatią. Za etiologię RASopatii odpowiadają w populacji polskich pacjentów pediatrycznych warianty molekularne w 13 genach, przy czym w 99% są to zmiany sensu. Najczęściej wykrywaną RASopatią u polskich pacjentów jest zespół Noonan (NS). Za etiologię zespołu sercowo-twarzowo-skórnego (CFCS) odpowiadają u 78% chorych zmiany w genie *BRAF* oraz w 22% w genach *MAP2K1* i *MAP2K2*. Z kolei zespół Costello (CS) u polskich pacjentów warunkowany jest w około 88% mutacją w genie *HARAS* (p.Gly12). Warianty liczby kopii nie są u polskich pacjentów odpowiedzialne za etiologię RASopatii. W wydzielonej części wniosków Autorka ustosunkowuje się do analizy klinicznej w zespole Noonan (NS), sercowo-twarzowo-skórnym (CFCS) i w zespole Costello (CS). Bardzo interesująca jest obserwacja, że ze wszystkimi zespołami z grupy RASopatii bardzo silnie korelują wady serca, z których najczęstszą jest zwężenie zastawki tętnicy płucnej. Obniżenia sprawności intelektualnej oraz zaburzeń neurologicznych występują z różną częstością i nasileniem we wszystkich badanych RASopatiach. W końcowej części wniosków, Autorka podsumowuje korelacje genotypowo-fenotypową w NS, CFCS i CS. Trzy główne wnioski końcowe dotyczą trudności w rozpoznawaniu określonego zespołu, gdzie nie jest możliwe wysunięcie podejrzenia jednoznacznej korelacji z wybranym genem ze szlaku Ras/MAPK. Wnioskiem

praktycznym przedstawionym przez Autorkę jest informacja, że uwzględnienie kryteriów oceny i różnicowania w połączeniu z nowatorskim podejściem metodycznym umożliwia u pacjentów z RASopatią wczesne rozpoznanie i potwierdzenie diagnozy klinicznej oraz podjęcie odpowiedniego postępowania profilaktycznego. Nie mam zastrzeżeń co do formy przedstawienia wniosków. Przedstawienie ich na sześciu stronach nie jest typowym rozwiązaniem, jednakże jest proporcjonalne do całości pracy.

W rozdziale **Publikacje** przedstawionym na 40 stronach, Autorka zamieszcza 552 pozycje. Jeśli Autorka wszystkie z nich przeczytała, to należą się Jej gratulacje. Niemniej, stanowią one bardzo ciekawy zbiór dla badaczy i personelu medycznego, zajmującego się badaniami o podobnej tematyce.

**Wniosek końcowy.** Zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o nadanie stopnia doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu magister Magdalenie Pelc. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz 1669 z późn. zm.). Ze względu na opracowanie bardzo szerokiej problematyki RASopatii zgłaszam **wniosek o wyróżnienie rozprawy**. Wyróżnienie uzasadniam wprowadzeniem w wyniku badań Kandydatki stałej modyfikacji klasycznego schematu postępowania kliniczno-molekularnego w odniesieniu do zespołów Noonan, sercowo-twarzowo-skórnego oraz Costello w Zakładzie Genetyki Medycznej Instytutu „Pomnik - Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie. Modyfikacje obejmują rutynowe prowadzenie po wstępnej klinicznej klasyfikacji pacjentów z głównymi objawami RASopatii, badań przesiewowych sekwencji kodującej 24 znanych genów ze szlaku Ras/MAPK, w postaci autorskiego panelu NGS. Ponadto przy występowaniu wskazań klinicznych prowadzone jest dodatkowo sekwencjonowanie całego eksomu oraz aCGH w ramach postępowania od genotypu do fenotypu. Tak zmodyfikowany schemat obniża koszty diagnostyki i skraca czas oczekiwania na wynik.



Prof. dr hab. n. med. Ryszard Słomski