

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Pelc pod tytułem:**

**Identyfikacja mutacji w genach szlaku sygnałowego Ras/MAPK i analiza ich korelacji z fenotypem zespołów: Noonan, sercowo-twarzowo-skrórnego oraz Costello**

Przedstawiona do recenzji rozprawa jest obszernym, liczącym 441 stron opracowaniem poświęconym genetycznie uwarunkowanej grupie zespołów zaliczanych do RASopatii. Choroby te związane są z mutacjami genów kodujących białka warunkujące przekazywanie sygnałów w obrębie kinaz białkowych aktywowanych mitogenami (Ras/MAPK). Znaczna heterogenność genotypowa tych zespołów stanowi istotne wyzwanie diagnostyczne nawet dla wytrawnego genetyka klinicznego. Doktorantka podjęła się więc trudnego zadania polegającego na opisanu fenotypów tych chorób występujących u pacjentów z polskiej populacji oraz określeniu profilu zmian molekularnych stanowiących podłoże tych zespołów.

Pracę otwiera tabela zawierająca alfabetyczny wykaz użytych w tekście licznych skrótów wraz z ich rozwinięciem i/lub definicją. Ponadto w tej części zawarto internetowe adresy dotyczące nazewnictwa i klasyfikacji wariantów molekularnych. Przed spisem treści dość nietypowo umieszczono rozdział: cel badań.

Dysertacja jest podsumowaniem wieloletnich badań realizowanych w IPCZD w ramach trzech grantów badawczych, w których Doktorantka uczestniczyła jako kierownik projektu (grant NCN) lub jako jeden z głównych wykonawców (grant MNiSW i projekt statutowy IPCZD). W trakcie prowadzonych badań zidentyfikowano ponad 120 pacjentów z rozpoznaną lub podejrzaną RASopatią. Zebrana grupa probantów stanowi jedną z największych w naszej populacji. Do rozprawy dołączono zgodę kierowników dwóch projektów na wykorzystanie przez Doktorantkę wyników uzyskanych w ramach realizowanych badań.

Głównym celem dysertacji było przeprowadzenie pogłębionej analizy fenotypowo-molekularnej zespołów: Noonan, sercowo-twarzowo-skrórnego, Costello oraz pokrewnych. Doktorantka przyjęła hipotezę badawczą, która zakładała, że zastosowanie nowoczesnych technologii badań molekularnych zwiększy wykrywalność RASopatii oraz pogłębi naszą wiedzę na temat mechanizmów odpowiedzialnych za występowanie tych zespołów. Z definicji, hipoteza badawcza musi być weryfikowalna, co w przypadku pierwszej części hipotezy nie mogło być zrealizowane w ramach tak zaplanowanych badań. Aby ocenić czy faktycznie doszło do zwiększenia wykrywalności, należałoby zaplanować badania w różnych przedziałach czasowych za pomocą różnych technologii a następnie dokonać porównania efektywności wykrywania zespołów. Wymagałoby to także przyjęcia założenia, że częstość mutacji warunkujących RASopatie jest stała w danej populacji. W przypadku diagnostyki genetycznej a priori można przyjąć, że hipoteza jest prawdziwa, ponieważ zastosowanie wysoce efektywnych metod molekularnych, takich jak NGS z pewnością będzie skutkowało większą wykrywalnością RASopatii oraz zwiększy skuteczność diagnostyki różnicowej. A zatem zdaniem recenzenta w tym przypadku zamiast formułować hipotezę badawczą lepiej byłoby podzielić cel badań na poznawczy i praktyczny. Doktorantka formułuje cele szczegółowe pracy, które sprowadzają się do:

- ustalenia podłoża molekularnego RASopatii,

- oceny stopnia patogenności nowych wariantów molekularnych,
- analizy profilu molekularnego oraz udziału genów w patogenezie zespołów,
- analizy cech klinicznych zespołów Noonan, CFCS oraz Costello,
- oceny korelacji genotyp: fenotyp,
- modyfikacji algorytmu diagnostycznego RASopatii przy zastosowaniu nowoczesnych technik molekularnych.

#### Wstęp

Liczący blisko 70 stron wstęp stanowi monograficzne opracowanie grupy chorób zaliczanych do RASopatii. Doktorantka omawia szczegółowo szlaki sygnałowe białek-kinaz aktywowanych mitogenami oraz diagnostykę kliniczną i molekularną zespołów: Noonan (NS), sercowo- twarzowo-skinowego (CFCS), Costello (CS), neurofibromatozy-Noonan (NF1/NS) oraz szeregu zespołów pokrewnych. Wstęp kończy rozdział na temat możliwości terapeutycznych wynikających ze znajomości poszczególnych elementów uczestniczących w szlakach sygnałowych kinaz białkowych oraz potencjalnego wykorzystania NGS w diagnostyce RASopatii. Ten fragment rozprawy napisany jest bardzo szczegółowo i wskazuje na doskonałą znajomość problematyki zespołów wchodzących w skład RASopatii wynikającą z wcześniejszych doświadczeń Doktorantki zdobytych podczas realizacji grantów badawczych finansowanych przez MNiSW, NCN oraz IPCZD zakończonych zgromadzeniem ponad 120 pacjentów z molekularnym potwierdzeniem zespołów wchodzących w skład RASopatii.

#### Materiał:

Badaniami objęto grupę 149 pacjentów niespokrewnionych z podejrzeniem RASopatii, w skład której wchodził: zespół NS/NS-like (n=120), CFCS (n=20) i CS (n=9). Ponadto badaniami objęto grupę 207 członków rodzin probantów. Kontrolę stanowiło 40 zdrowych osób rejestrowanych w IPCZD. Biorąc pod uwagę populacyjną częstość tych zespołów liczba zgromadzonych pacjentów robi wrażenie. W tej części pracy należałoby jednak szerzej omówić metodologię rekrutacji oraz kryteria włączenia pacjentów do badań. Brakuje też choćby bardzo ogólnej charakterystyki grupy kontrolnej (skąd pochodziły osoby, wiek, płeć itp.). Materiałem do badań było genomowe DNA uzyskane z próbek krwi obwodowej. Na pobranie krwi oraz przeprowadzenie badań uzyskano zgodę pacjentów/rodziców dzieci. Na całość badań uzyskano zgodę komisji etycznej IPCZD.

#### Metodyka:

Realizacja badań przebiegała z wykorzystaniem aparatury będącej w posiadaniu IPCZD. Przeprowadzenie sekwencjonowania nowej generacji (NGS) zrealizowano w ramach współpracy naukowej z ZGM WUM, *Baylor College of Medicine - Human Genome Sequencing Center (BCM-HGSC)* i *Baylor Hopkins Center for Mendelian Genomics (BHCMG)*. Opis metodyki molekularnej wykorzystanej w trakcie badań musi budzić uznanie. Doktorantka, krok po kroku podaje szczegółowe informacje dotyczące izolacji DNA, wykorzystanych odczynników, buforów i starterów. Precyzyjnie opisuje metodologię oraz warunki dla reakcji PCR i dla MLPA. Podobnie szczegółowo opisano metodykę oraz bioinformatyczną analizę mikromacierzy całogenomowych (aCGH). Sekwencjonowanie genomu przebiegało z wykorzystaniem klasycznej metody Sangera oraz NGS. Analizę wyników sekwencjonowania wg Sangera przeprowadzano za pomocą komputerowego programu *Mutation Surveyor (SoftGenetics)*. NGS wykonano z wykorzystaniem platformy firmy Illumina. Analizę WES przeprowadzono na aparacie HiSeq2000, w ramach współpracy naukowej z *Baylor College of Medicine* i *Human Genome Sequencing Center* (Texas, USA). Analizę eksomu klinicznego (panel TruSight One) i panelu 1000 genów przeprowadzono na aparacie HiSeq1500, w ramach współpracy naukowej z Zakładem Genetyki Medycznej WUM. Autorka metodycznie omawia algorytm diagnostyczny zastosowany w przypadku WES, celowanej analizy > 4800 genów

zawierających 15 genów wykazujących związek z RASopatiami oraz autorskiej puli 1000 genów zawierających 21 genów skorelowanych z tą grupą chorób. Niezwykle istotnym elementem rozdziału dotyczącego metodyki jest analiza bioinformatyczna danych uzyskanych z NGS oraz identyfikacja wariantów molekularnych i ich ocena w odniesieniu do fenotypu pacjentów. Ta złożona procedura wymagająca zastosowania skomplikowanych procedur obliczeniowych przeprowadzona została za pomocą dedykowanych programów komputerowych z wykorzystaniem baz danych wariantów molekularnych. Należy podkreślić, że szczegółowa lista programów wraz z ich opisem oraz wykaz wykorzystanych baz danych zostały umieszczone w dodatkowych tabelach na końcu pracy. Doktorantka przedstawia procedurę stopniowego „przesiewania” wariantów molekularnych prowadzącą do identyfikacji kodujących wariantów patogennych lub genów kandydujących. Ocenę patogenności wariantów molekularnych *in silico* przeprowadziła na podstawie zmian w strukturze/funkcji kodowanych białek przy wykorzystaniu algorytmów predykcyjnych. Opis wykorzystanych algorytmów także zamieszczono w dodatkowych tabelach na końcu pracy. W celu eliminacji odczytów zduplikowanych oraz dla lepszej specyfiki i wyższej wykrywalności uzyskanych wariantów molekularnych zastosowała procedurę powtórnej kalibracji oraz *re-alignment*. Analizę związku / korelacji pomiędzy niesynonimicznymi wariantami molekularnymi a fenotypem przeprowadzono za pomocą testu niezależności  $\chi^2$ .

Podsumowując, zastosowana w badaniach metodyka molekularna obejmuje najnowocześniejsze techniki badania genomu. Podany opis metodologii jest kompletny i dowodzi dogłębnej znajomości tych technik przez Doktorantkę. Na podkreślenie zasługuje staranność opisów poszczególnych technik oraz wykorzystanie baz danych i bioinformatycznych programów komputerowych analizujących wyniki uzyskane w trakcie NGS, podnoszących wiarygodność sekwencjonowania w odniesieniu do stwierdzanego fenotypu.

Wyniki:

Badania przeprowadzone w grupie 149 probantów z klinicznym podejrzeniem RASopatii pozwoliły na identyfikację molekularnego podłoża choroby u 128. W tym u 121 potwierdzono kliniczne rozpoznanie RASopatii, u 7 probantów stwierdzono obecność zmian molekularnych odpowiadających innym zespołom genetycznym. Wśród 207 przebadanych członków rodzin u 25 wykazano obecność identycznych wariantów molekularnych jak stwierdzane u probantów z RASopatią. W pierwszym etapie badań sekwencjonowanie przeprowadzono klasyczną metodą Sangera, w drugim wykorzystano NGS. Za pomocą metody Sangera w grupie 117 probantów zidentyfikowano podłoże molekularne RASopatii u 90. Badanie NGS przeprowadzono u 49 pacjentów z podejrzeniem RASopatii w tym u 17 probantów z prawidłowym wynikiem sekwencjonowania metodą Sangera oraz 32 probantów, u których NGS wykorzystano jako badanie pierwszego rzutu. Analizę eksomu klinicznego wykonano u 33 probantów, stwierdzając obecność patogennych lub prawdopodobnie patogennych wariantów u 21. Warianty te korelowały z fenotypem RASopatii. Dla 6 probantów przeprowadzono analizę celowaną 1000 genów stwierdzając obecność patogennych wariantów u 4. W grupie 10 probantów z typowymi objawami wskazującymi na NS oraz z prawidłowymi wynikami sekwencjonowania Sangera i aCGH, przeprowadzono badania rodzinne z zastosowaniem WES (*trios*: rodzice i dziecko). U 6 probantów zidentyfikowano warianty patogene obecne w szlaku sygnałowym RAS/MAPK. Ponadto poszerzona analiza eksomu klinicznego doprowadziła do zidentyfikowania dwóch rzadkich wariantów genów ANKRD11 i ALDH18A1 korelujących z objawami klinicznymi zespołu NS i CFCS. W sumie podczas przeprowadzonych badań molekularnych, mimo zastosowania metody NGS, nie udało się ustalić podłoża molekularnego jednoznacznie korelującego z RASopatią u 14 probantów. W efekcie całkowita wykrywalność zmian molekularnych w całej badanej grupie RASopatii wynosiła 81%, odpowiednio w NS/NS-like -76%, CFCS-90% i CS -89%. Badanie aCGH przeprowadzone w

grupie 24 probantów, u których wykluczono obecność wariantów typowych dla RASopatii za pomocą metody Sangera, nie wykazały dużych rearanżacji wykazujących korelację z zespołami zaliczanymi do RASopatii. Występujące u 3 pacjentów rearanżacje nie miały związku z tą grupą chorób. W sumie analiza molekularna pozwoliła na zidentyfikowanie 74 wariantów molekularnych występujących w obrębie 13 dotychczas poznanych genach kodujących etapy szlaku sygnałowego RAS/MAPK. Zdecydowaną większość wariantów stanowiły substytucje warunkujące zmianę sensu kodowanego aminokwasu (*missense mutation*). Zidentyfikowano 15 nowych, dotychczas nieopisanych wariantów, spośród których 11 miało patogenny lub prawdopodobnie patogenny charakter na podstawie oceny *in silico*.

Doktorantka wykazała, że najczęstszą RASopatią w naszej populacji jest NS. Potwierdziła znaczną heterogenność tego zespołu, jednocześnie stwierdzając, że najczęstszą przyczyną zespołu były mutacje genu PTPN11. Pozostałe geny, które były odpowiedzialne za etiologię zespołu, to: SOS1 (u 18%), RIT1 (u 10%), RAF1 (u 5%), KRAS, BRAF, NF1, SHOC2 i LZTR1 (1-2%). Autorka zidentyfikowała najczęstsze miejsca mutacji (*hot spots*) w obrębie genów PTPN11, SOS1 i RIT1. Interesującym spostrzeżeniem było wykazanie recesywnego modelu dziedziczenia NS – związanego z niektórymi mutacjami genu LZTR1. Etiologia zespołu SFCS była warunkowana mutacjami genów BRAF (najczęściej) oraz MAP2K1 i MAP2K2. Jedynym homogennym zespołem w grupie RASopatii był CS, w którym udało się znaleźć *hot spot* odpowiedzialny za 88% mutacji genu HRAS. Oryginalnym spostrzeżeniem było zidentyfikowanie w badanej grupie probantów bardzo rzadkich postaci RASopatii – Noonan-like, takich jak NSML, NSLH, NFSN, CMAVN. Za występowanie NS z plamami soczewicowatymi (NSML) odpowiadały mutacje genów PTPN11 (90%) i RAF1. Zespół Noonan z luźnymi włosami (NSLH) warunkowany był tylko jedną zmianą w genie SHOC2. Za zespół Noonan/neurofibromatoza – odpowiadały tylko mutacje w genie NF1. Na tej podstawie mimo podobieństwa niektórych objawów do NS, Doktorantka wyłączyła NSNF z grupy RASopatii. Autorka określiła objawy fenotypowe, które są wspólne dla większości RASopatii. Do objawów tych należały: małogłowie, nisko osadzone uszy, hiperteloryzm, krótka szyja. Do najczęstszych wad występujących wśród probantów z NS, CFCS i CS należały wady wrodzone serca występujące w 80% przypadków RASopatii. Najczęstszą postacią wady było zwężenie zastawki tętnicy płucnej (PVS), stwierdzanej u 53% pacjentów z NS. Deficyty intelektualne najrzadziej występowały u pacjentów NS w porównaniu do CFCS i CS. Ważnym elementem badań była analiza korelacji genotyp: fenotyp. Dla NS i CFCS została przeprowadzona w odniesieniu do udziału poszczególnych genów uczestniczących w etiologii zespołów. W przypadku homogennego zespołu CS możliwa była ocena związku objawów fenotypowych z różnymi mutacjami genu HRAS. W przypadku NS, najbardziej znaczące korelacje stwierdzono w stosunku do mutacji PTPN11. Dotyczyło to niepełnosprawności intelektualnej, niskorosłości oraz PVS. W przypadku CFCS pełnoobjawowa postać zespołu występowała w przypadku mutacji genu BRAF. W odniesieniu do CS typowe objawy fenotypowe stwierdzano w mutacji dotyczącej kodonu 12 genu HRAS. Nie zaobserwowano występowania nowotworów złośliwych dla stwierdzanych wariantów genu HRAS. Rozdział poświęcony wynikom badań jest napisany szczegółowo i przejrzysto, zawiera liczne tabele i ryciny. Istotnym uzupełnieniem wyników są dodatkowe tabele oraz ryciny znajdujące się w części końcowej, zawierające szczegółową dokumentację zrealizowanych badań.

## Dyskusja

W pierwszej części dyskusji Doktorantka przeprowadza szczegółowe porównanie wyników molekularnych uzyskanych w badanej grupie probantów z danymi pochodzącymi z piśmiennictwa. Porównanie genów odpowiedzialnych za etiologię NS, CFCS i CS przedstawia w formie tabel oraz

rycin. Autorka stwierdziła, że rodzinne przypadki NS/NS-like występują rzadziej (32%) niż w danych pochodzących od innych autorów (30-75%). Ponadto wykazała, że podobnie jak w cytowanym piśmiennictwie dziedziczenie zespołu NS ma najczęściej związek z mutacjami genów *PTPN11*, *SOS1*, *RIT1* i mutacja częściej przekazywana jest przez matkę niż przez ojca. W porównaniu do piśmiennictwa rozkład zmutowanych genów wśród pacjentów z NS był podobny chociaż nieco częściej wykrywano zmiany w genie *PTPN11* i *SOS1* oraz dwukrotnie częściej stwierdzano mutacje w *RIT1*. W przypadku zespołu CFCS głównym czynnikiem etiologicznym były mutacje genu *BRAF* a ich częstość w badanym materiale była zbliżona do innych populacji. Homogeny w sensie genetycznym zespół CS wykazywał w badanej grupie probantów podobną do danych z piśmiennictwa częstość „gorących miejsc” mutacji. Podobnie jak w piśmiennictwie, Autorka w badanej grupie nie stwierdziła występowania rodzinnego CS. Jednocześnie stwierdzana zależność między ryzykiem posiadania potomstwa z CS a wiekiem ojca ma związek z faktem, że większość mutacji *HRAS* dotyczyła allele ojcowskiego. Doktorantka omawia także pacjenta z mutacjami obu alleli genu *LZTR1* odpowiadającymi za recesywny model dziedziczenia zespołu NS. W kolejnych rozdziałach dyskusji Doktorantka szczegółowo omawia profile zmian fenotypowych w grupie probantów a następnie odnosi się do danych z piśmiennictwa. Wyniki porównań dla każdego zespołu zostały oddzielnie przedstawione w tabelach oraz na rycinach. Z przedstawionych rycin wynika, że większość objawów stwierdzanych w NS/NS-like była rzadziej obserwowana w badanej grupie probantów niż podawana w piśmiennictwie. Wyjątek stanowiły: hipotonia, niskorosłość, trudności w nauce, krótka pletwiasta szyja oraz nisko schodząca linia włosów na karku. Ponadto, częściej stwierdzano zaburzenia krzepnięcia oraz wnetrostwo. W przypadku zespołu CFCS, częściej niż wśród porównywanych populacji występowały zaburzenia w układzie mięśniowo-szkieletowym, niektóre objawy dysmorficzne w obrębie twarzowej części czaszki oraz zaburzenia ektodermalne. Natomiast znacząco częściej obserwowano wnetrostwo, wytrzeszcz gałek ocznych, zez oraz niedosłuch. CS jako najbardziej homogeny etiologicznie, wykazywał największą zgodność z danymi z piśmiennictwa, ale należy zaznaczyć, że liczebność tej grupy była najmniejsza. Generalnie ta część dyskusji została przeprowadzona niezwykle szczegółowo. Wypunktowane zostały wszystkie różnice w zakresie poszczególnych objawów oraz przeprowadzono analizę statystyczną ( $\chi^2$ ) odniesieniu do danych z piśmiennictwa. Trzeba jednak zaznaczyć, że stosowanie testów statystycznych dla każdego objawu z osobna w przypadku tak dużej ich liczby jest obciążone ryzykiem błędu wynikające z wielokrotności porównań. Ponadto populacje, do których odnoszono wyniki nie są homogenne co dodatkowo ogranicza znaczenie analiz statystycznych i ma niewielkie przełożenia na praktykę kliniczną. W końcowej części dyskusji Doktorantka analizuje wyniki korelacji genotyp: fenotyp w obrębie poszczególnych zespołów. Zestawione w tabeli 17 wyniki dla NS/NS like przedstawiają rozkład poszczególnych objawów względem genów wykazujących mutację. Doktorantka przeprowadziła analizę statystyczną tych rozkładów zaznaczając charakterystyczne dla poszczególnych genów objawy występujące z wyższą częstością w porównaniu do pozostałych genów odpowiedzialnych za wystąpienie zespołu. Do analizy można też mieć zastrzeżenia związane z faktem małych liczebności szczególnie w odniesieniu do genów *RAF1* i *RIT1*. Doktorantka porównała częstości objawów stwierdzanych w przypadku mutacji genów *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1* oraz *RIT1* z odpowiadającymi częstościami cytowanymi w piśmiennictwie. Podobne porównania rozkładu objawów względem mutacji poszczególnych genów w stosunku do danych z piśmiennictwa przeprowadzono dla CFCS i CS. Osobno omówione zostały zespoły NF1/NS i CMAVM. Doktorantka odnosi się także do kwestii zwiększonego ryzyka występowania nowotworów w zespołach RASopatii, zwracając uwagę na sporadycznie występujące przypadki nowotworów w NS, natomiast wśród probantów z CFCS i CS nie stwierdzono nowotworów. W osobnym podrozdziale Doktorantka przedstawia dyskusję odnośnie poszerzonych wyników badań z wykorzystaniem NGS w grupie probantów z podejrzeniem RASopatii, u których nie wykazano wariantów molekularnych w standardowym sekwencjonowaniu ani w badaniu aCGH. Szczegółowo omawia zidentyfikowane w trakcie rozszerzonej analizy eksomu (trios) zespoły: KOGS i

*arthrogryposis type 8/multiple pterygium*, które stanowią unikatowe w skali światowej opisy przypadków. Sekwencjonowanie eksomu klinicznego pozwoliło zidentyfikować dwa zespoły nie należące do RASopatii i związane z mutacjami ANKRD11 (zespół KBG) oraz ALDH18A1 (*cutis laxa* / spastyczna paraplegia). Zespoły warunkowane mutacjami tych genów figurują w bazie OMIM. U 14 probantów badaniem NGS nie udało się zidentyfikować mutacji odpowiedzialnej za obserwowany zespół objawów. Doktorantka odnosi się także do pojedynczych przypadków nie zrównoważenia genomu stwierdzanych w badaniu aCGH. Stwierdza, że badania takie należy wykonać u pacjentów z cechami dysmorficznymi sugerującymi RASopatię, u których brak molekularnych wariantów w zakresie szlaków sygnałowych RAS/MAPK. Na zakończenie dyskusji, uzasadnia, że wprowadzenie techniki NGS ma kluczowe znaczenie dla poszerzenia naszej wiedzy na temat etiologii RASopatii, ułatwia diagnostykę różnicową, wpływa na przyspieszenie i zmniejszenie kosztów postępowania diagnostycznego oraz otwiera drogę do opracowania potencjalnych metod terapii. Dowodzi słuszności stwierdzenia „*genotype first*”. W końcowej części rozdziału znajduje się diagram przedstawiający algorytm postępowania diagnostycznego opracowany na podstawie wniosków wynikających z badań Doktorantki. Jest to bardzo istotny praktycznie element, który powinien znaleźć się w każdej poradni genetycznej, prowadzącej poradnictwo genetyczne.

## Wnioski

Zawarte są w 26 punktach, które podzielono na:

- wnioski z analiz molekularnych (1-12)
- wnioski dotyczące analiz klinicznych (13-20)
- wnioski obejmujące korelację genotyp: fenotyp (21-23)
- wnioski końcowe (24-26)

W opinii recenzenta punkty 1-9 i 13-23 stanowią *de facto* podsumowanie wyników, które potwierdzają realizację założonych przez Doktorantkę celów rozprawy. Faktyczne wnioski rozprawy, wynikające z przeprowadzonych badań zostały zawarte w punktach 10-12 i 24-26. Są zasadne i zawierają ważne przesłanie dla lekarzy zajmujących się poradnictwem genetycznym wskazując na nowoczesne i najbardziej efektywne postępowanie diagnostyczne w przypadkach RASopatii. Wnioski te można z łatwością uogólnić na inne zespoły dysmorficzne, w których diagnostyka fenotypowa nie stanowi klucza do ostatecznego rozpoznania klinicznego.

Z obowiązku recenzenta chciałbym zwrócić uwagę pewne błędy redakcyjne jakie występują w pracy. W kilku miejscach Doktorantka używa terminu waga urodzeniowa zamiast masa urodzeniowa. Ponadto np. na stronie 209, rycina 10 podaje, że „waga” urodzeniowa w stosunku do wieku płodowego była za duża, przytaczając wartość  $\geq 50$  centyla. Z definicji, duża urodzeniowa masa ciała w stosunku do wieku płodowego definiowana jest  $> 90$  centyla (*LGF-Large for Gestational Age*). Przedział 10-90 centyl uznawany jest za odpowiedni do wieku płodowego (AGA). W kilku rozdziałach (str. 179, 194, 220-221) i w tabelach zatytułowanych „wady serca” wymieniane są zaburzenia rytmu, które oczywiście mogą towarzyszyć wadom, ale nie zaliczają się do wad wrodzonych serca. Te tytuły należałoby zmienić na: wady wrodzone serca i zaburzenia rytmu (zmiany w zapisie EKG). Na stronie 224 Doktorantka używa terminu anomalie prenatalne pisząc o zwiększonej przezierności karku, wielowodziu czy makrosomii płodu. Ten termin może być mylący, dlatego proponowałbym użycie: zmiany prenatalne wykrywane w badaniu usg.

Podsumowanie oceny dysertacji:

rozprawa jest obszernym, monograficznym opracowaniem dotyczącym grupy zespołów związanych z zaburzeniami w zakresie funkcjonowania szlaków sygnałowych RAS/MAPK. Dotyczy znaczącej w sensie liczbowym populacji probantów z cechami klinicznymi sugerującymi rozpoznanie RASopatii. Doktorantka wykazała się dogłębną znajomością nowoczesnych technik molekularnych co znalazło odbicie w precyzyjnym opisie metod wykorzystanych w badaniach. Przeprowadzona analiza profilu zmian fenotypowych, molekularnego podłoża oraz korelacji fenotyp genotyp w grupie RASopatii została przeprowadzona w sposób profesjonalny z precyzyjnym omówieniem zmian stwierdzanych w każdym z zespołów. Dysertacja dowodzi, że Doktorantka doskonale poradziła sobie z rozpracowaniem tej heterogennej grupy zespołów dysmorficznych. Recenzent docenia ogromny wysiłek jaki Doktorantka musiała włożyć w przygotowanie rozprawy, której efektem jest kompleksowa charakterystyka fenotypowa i genotypowa grupy zespołów zaliczanych do RASopatii, w populacji polskiej. Uzyskane w trakcie przeprowadzonych badań wyniki posiadają zarówno istotne znaczenie poznawcze: opisanie nowych genów kandydujących, opisanie nowych zespołów dysmorficznych, nie zaliczających się do RASopatii, ale przede wszystkim ważne znaczenie praktyczne, dzięki opracowaniu profilu zmian fenotypowych oraz genotypowych RASopatii a także zaproponowaniu optymalnego algorytmu postępowania diagnostycznego.

Stwierdzam, że 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. Przepisy wprowadzające ustawę – prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U z 2018 r. poz 1669 z późn. zm. Na tej podstawie przedstawiam Radzie Dyscyplin Medycznych WUM wniosek o dopuszczenie mgr Pelc do publicznej obrony doktorskiej. Jednocześnie ze względu na wysoką ocenę dysertacji wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.



Prof. Dr hab. Jacek Józef Pietrzyk