

Warszawa 13 sierpnia 2020 r.

dr hab. n .med. Magdalena Chechlińska, prof. NIO
Zakład Immunologii
Narodowy Instytut Onkologii
im. Marii Skłodowskiej-Curie – PIB
w Warszawie

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr. Victora Murcii Pienkowskiego
pt.: „Mapowanie punktów złamań w zrównoważonych objawowych translokacjach
chromosomowych”.**

Praca doktorska mgr. Victora Murcii Pienkowskiego pt.: „Mapowanie punktów złamań w zrównoważonych objawowych translokacjach chromosomowych”, przygotowana pod kierunkiem prof. Rafała Płoskiego, wpisuje się w niezwykle aktualny i istotny nurt badań poświęconych zależnościom pomiędzy genotypem a fenotypem. Dzięki rozwojowi technik molekularnych, w tym w ostatnich latach sekwencjonowania nowej generacji (NGS), mapowanie relacji genotyp-fenotyp i identyfikacja mutacji oraz ich interakcji w kontekście zmian chorobowych stały się przedmiotem intensywnych i coraz bardziej precyzyjnych badań.

Doktorant przyjął założenie, że wysoki odsetek (ponad 25%) symptomatycznych przypadków wśród nosicieli zrównoważonych translokacji chromosomowych *de novo* świadczy o związku przyczynowo skutkowym pomiędzy stwierdzanymi rearanżacjami a obserwowanym fenotypem. Stwierdził, że „*nosiciele objawowych zrównoważonych translokacji chromosomowych są naturalnym układem eksperymentalnym, w którym uszkodzone geny i/lub elementy regulatorowe odpowiadają za patologiczny fenotyp pacjenta*”. Postanowił więc zidentyfikować geny/*loci* odpowiedzialne za objawy u nosicieli zrównoważonych translokacji chromosomowych *de novo*. W tym celu u 11 pacjentów, u których wykryto takie translokacje, i którzy charakteryzowali się zmianami fenotypowymi, za pomocą całogenomowego sekwencjonowania typu „mate pair” w technologii sekwencjonowania nowej generacji zbadał miejsca złamań chromosomów. Doktorant wykazał uszkodzenia w odcinku niekodującym oraz w 13 genach kodujących, w tym w 5 o nieznanym dotychczas wpływie na fenotyp. Następnie Doktorant wykorzystał 3 bazy danych w celu określenia jakie choroby powodowane są przez patogenne warianty zidentyfikowanych genów oraz czy geny te dziedziczone są w sposób autosomalny dominujący, poprzez sprawdzenie w jakim stopniu określony gen toleruje warianty typu utraty funkcji oraz czy wariant jednej kopii genu będzie powodował chorobę. Na tej podstawie stwierdził, że większość zidentyfikowanych genów może być dziedziczona w sposób autosomalny dominujący. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę właściwej komisji bioetycznej.

Praca doktorska ma formę monografii. Liczy 96 stron i zawiera następujące rozdziały, w typowym dla prac naukowych układzie: Wstęp, Założenia i Cel pracy, Grupa badana, materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Piśmiennictwo. Praca opatrzona jest również spisem treści, spisem rycin, wykazem skrótów oraz streszczeniem w języku angielskim i polskim, a także zawiera listę słów kluczowych w języku polskim i angielskim, informację o źródłach finansowania badań i publikacjach części wyników pracy.

We **wstępie** Doktorant w sposób sprawny przedstawił przesłanki pracy, problematykę mapowania miejsc złamań chromosomów i skrótko uzasadnił przyjęty model badawczy. Doktorant zdefiniował zrównoważone translokacje chromosomowe. W dość ogólny sposób ujął mechanizmy efektów patogennych wywoływanych przez zrównoważone aberracje chromosomowe. W pracy w dużej mierze poświęconej temu zagadnieniu należało rozwinąć ten aspekt w odrębnym podrozdziale. Szczegółowo natomiast przedstawił zaburzenia fenotypowe powodowane przez te aberracje, wymienił cały szereg genów, które zostały już powiązane z określonymi zaburzeniami fenotypu, jednak spośród zidentyfikowanych przez doktoranta, a znanych już wcześniej w kontekście omawianych fenotypów, wymienił we wstępie jedynie *TRPS1*. Następnie Doktorant zgrabnie ujął najważniejsze zagadnienia z zakresu metod mapowania miejsc złamań i opisał metody sekwencjonowania nowej generacji, ze szczególnym uwzględnieniem zastosowanej przez niego technologii firmy Illumina, przedstawiając istotne cechy zastosowanej metodyki i wykazując jej potencjał jako narzędzia do precyzyjnego badania punktów złamań chromosomów. Wstęp zilustrował cennymi rycinami.

Kolejny rozdział Doktorant zatytułował „**Założenia i cel pracy**”, jednak nie podsumował założeń, które zostały opisane już we wstępie, a przedstawił jedynie cel pracy. Doktorant używa tu wyrażenia „cel rozprawy” (którym jest uzyskanie stopnia naukowego), zapewne mając na myśli „cel pracy, cel badań”. Cel ujęty w jednym zdaniu sformułowany został z błędami redakcyjnymi i interpunkcyjnymi. Pisząc o „*nowych loci niepowiązanych lub słabo powiązanych z nieprawidłowym fenotypem u ludzi*” doktorant miał zapewne na myśli *geny/loci* o nieznanym lub jak dotychczas słabo poznanym związku z nieprawidłowym fenotypem. Fraza „*z wykorzystaniem płytkiego sekwencjonowania MP-WGS przeprowadzonym na pacjentach, u których wykryto de novo BCTs*”, zapewne miała brzmieć <<z wykorzystaniem płytkiego sekwencjonowania MP-WGS DNA pacjentów, u których wykryto BCT *de novo*>>.

Następnie Doktorant opisał **grupę badaną oraz materiały i metody**. Precyzyjnie omówił źródło materiału do badań i kryteria włączenia, przedstawił również kryteria wykluczenia. W opisie kryteriów wykluczenia zabrakło *rationale* tych wykluczeń, zapewne Doktorant wyszedł z założenia, że jest to oczywiste, jednak w pracy naukowej należałoby takie uzasadnienie umieścić. Szczegółowo Doktorant przedstawił opisy kliniczne poszczególnych przypadków (probandów 1 – 11), w których zawarł wszystkie informacje istotne dla przedmiotu pracy, Jednak wkradły się tu pewne drobne niekonsekwencje, mianowicie w opisie probanta 5 (str. 33) brak informacji o rodzicach (we wszystkich pozostałych przypadkach byli „*zdrowi i niespokrewnieni*”), a opis kliniczny probanta 7: str. 34 odbiega od pozostałych.

Schemat badania, zastosowane metody wraz z kontrolami zostały prawidłowo dobrane do założeń i celów pracy oraz dokładnie i klarownie przedstawione. Opisy Doktorant wzbogacił przydatnymi schematami graficznymi. Świadczy to o biegłości Doktoranta zarówno w metodyce laboratoryjnej jak i analizach bioinformatycznych. Należy podkreślić, że Doktorant wykazał się opanowaniem szeregu współczesnych metod biologii molekularnej (w tym, NGS, PCR, sekwencjonowanie metodą Sanger), metod hodowli komórek *in vitro*, metod bioinformatycznych analiz wyników sekwencjonowania oraz analiz w oparciu o bazy danych dostępne *on-line*. Niestety w metodyce nie opisano analiz „bootstrap”, o których mowa w dyskusji, natomiast sposób identyfikacji domen powiązanych topologicznie (str. 45) praktycznie nie został opisany, a odwołuje się do publikacji co jest typowe dla publikacji w czasopiśmie naukowych, jednak nie jest to dobra praktyka w pracy doktorskiej. Brak wyjaśnienia co to jest Hii-C.

Wyniki zostały szczegółowo opisane w 11 podrozdziałach, z których każdy poświęcony jest jednemu probantowi, zilustrowane na 27 czytelnych rycinach i wsparte 3 tabelami. Oddzielny opis wyników dla każdego z przypadków to układ spotykany w badaniach genetycznych, gdzie każdy przypadek, na co również doktorant zwrócił uwagę, jest w pewnym sensie odrębnym „układem eksperymentalnym”. Wiele publikacji naukowych dotyczących problematyki genetycznych uwarunkowań fenotypów klinicznych dotyczy wyłącznie jednego przypadku. Doktorant uzyskał w pełni oryginalne wyniki, zidentyfikował 4 geny (*EFNA5*, *BAHD1*, *PPP2R5E*, *DKK2*), których uszkodzenia nie były dotychczas wiązane z jakąkolwiek chorobą u ludzi oraz potwierdził lub poszerzył spektrum chorób (objawów/fenotypów), które mogą być kojarzone z mutacjami w 9 genach (*NAA15*, *SLC6A1*, *SLC4A10*, *RET*, *TRPS1*, *EBF3*, *LARGE*, *ZNF423* oraz *NIPBL*).

Dyskusję Doktorant otwiera krótką rekapitulacją zidentyfikowanych genów uszkodzonych w wyniku zrównoważonych translokacji i opisem analiz mających oszacować czy te geny są dziedziczone w sposób autosomalny dominujący. Wydaje się, że opisy tych analiz powinny być znaleźć się w wynikach, a w tym miejscu, zamiast przytaczać wartości uzyskanych współczynników i poziomy ufności, Doktorant powinien wprost napisać co z tych analiz wynikało. Ponadto Doktorant mało klarownie przedstawia niniejsze analizy. W ostatnim zdaniu na str. 75 pisze „Dla 11 z 13 genów, wartości pLI oraz DOMINO można uznać za świadczące o możliwym dziedziczeniu autosomalnym dominującym ($>0,7$).” A już w kolejnym zdaniu wymienia nie 2 a 4 geny (*EFNA5*, *BAHD1*, *PPP2R5E*, *TXNDC5*), dla których „wpływ na fenotyp pacjenta był niejasny”, w żaden sposób nie definiując tej „niejasności”. Co więcej, nie zalicza do tej grupy genu *SLC4A10*, którego dziedziczenie wg bazy OMIM jest tak samo nieznanne jak wymienionych przez Doktoranta 4 genów, a wartości pLI i AD wyniosły dla *SLC4A10* odpowiednio 0 i 0,2, a więc znacznie poniżej granicznej wartości 0,7. Ponadto nie jest jasne, czy w analizie „bootstrap” geny wybierane losowo do określenia mediany były wyłącznie genami dziedziczonymi w sposób dominujący.

Zasadniczą dyskusję doktorant prowadzi odrębnie dla każdego przypadku. Doktorant poprawnie analizuje mechanizmy molekularne, poprzez które miejsca pęknięć mogą generować dominujące mutacje patogenne. Mam uwagę odnośnie dyskusji nt. wyników u probanta 7, któremu Doktorant potraktował po macoszemu, poświęcając mu jedynie 4 linijki tekstu, w tym twierdzenie, że: „W związku z faktem, że pacjent został skierowany na badanie właśnie z podejrzeniem zespołu włosowo-nosowo-palczkowego typu 1, należy uznać, że przyczyną choroby jest gen uszkodzony przez translokację.”, co trochę brzmi jak samospelniająca się przepowiednia. Tak naprawdę ten przypadek nie został przedyskutowany.

Odrębne omawianie każdego probanta jest uzasadnione w tego typu pracy, ale Doktorant powinien podsumować uzyskane dane nt. potencjalnego związku genotyp-fenotyp np. w postaci tabeli, w której wskazałby związek uszkodzeń poszczególnych genów z konkretnym fenotypem w kontekście danych wynikających z literatury. Dane do takiej tabeli znajdują się w pracy w końcowych zdaniach dyskusji wyników uzyskanych u poszczególnych probantów, np. ostatnie zdanie z dyskusji 8.3 (probant 3) brzmi: „*Niezależnie od dokładnej przyczyny wydaje się, że translokacje w genie SLC4A10, zlokalizowane blisko końca 5' genu, powodują dominującą niepełnosprawność intelektualną, ponieważ łącznie z przypadkiem przedstawionym w tej pracy zaobserwowano ten fenotyp, z nieznacznymi różnicami, u trzech pacjentów*[79, 80].”

W podsumowaniu powinna się również znaleźć dyskusja obejmująca rolę badania mutacji w odkrywaniu mechanizmów w warunkach fizjologicznych, patologicznych i w diagnostyce. Inna bardzo istotna kwestia, której w pracy Doktorant nawet nie zasygnalizował, to trudności w badaniu związku przyczynowo skutkowego gen-fenotyp, nie wspomniał, że prosta korelacja między genotypem a fenotypem nie istnieje, że fenotyp jest znacznie bardziej złożony niż genotyp. A to akurat byłoby doskonałą przesłanką do podjętych badań punktów złamań w zrównoważonych translokacjach. Jednak nie uzasadnił dlaczego „*nosiciele objawowych zrównoważonych translokacji chromosomowych są naturalnym układem eksperymentalnym, w którym uszkodzone geny i/lub elementy regulatorowe odpowiadają za patologiczny fenotyp pacjenta*” – potraktował to jako oczywistość. W kontekście niejednoznaczności wyników Doktorant powinien był jednak wspomnieć np. o dziedziczeniu wielogenowym, o regulacji epigenetycznej, o efektach zależnych od interakcji na poziomie genów i ich produktów: efektach synergistycznych (inaczej *synthetic*) lub maskujących. Nawet bowiem w typowo jednogenowej chorobie jaką jest mukowiscydoza, nie da się przewidzieć fenotypu klinicznego na podstawie mutacji w genie *CFTR*, opisano co najmniej 7 genów modyfikujących fenotyp kliniczny tej – wydawałoby się – genetycznie nieskomplikowanej choroby. W świetle tej złożoności, w mojej opinii zbyt radykalna jest teza ujęta w dyskusji nt. probanta 3 (str. 79), że obecność zidentyfikowanych wariantów u jednego ze zdrowych rodziców „*wyklucza ich związek z objawami u pacjenta*”. Czy nie może tak być, że taki wariant u osoby określonym tłem genetycznym wpływa jednak na ostateczny fenotyp?

Doktorant powinien również odnieść się do czułości i przydatności metody (tu odsyłam np. do dyskusji w publikacji Redin et al. 2017) i ewentualnych perspektyw stosowania metody NGS *mate-pair* w diagnostyce, co jest tym ważniejsze, że w streszczeniu Doktorant wyeksponował sprawę walidacji metody jako pierwszy wniosek. Doktorant przemilczał sprawę nieuszkodzenia żadnego genu u probanta 11; czy miał na myśli całe geny, razem z promotorem i UTR? A może należało napisać <<żadnego znanego genu>>? Zabrakło również uzasadnienia dlaczego w przypadkach wykrycia uszkodzeń genów kodujących białka porzeczono na tym i nie badano genów z danej domeny. Czy ekspresja innych genów w ich domenie nie mogła być zmieniona, np. poprzez efekt pozycji? Badania TAD Doktorant przeprowadził tylko w przypadku probanta 6 i 11. Uzasadnienie badania TAD można by ująć w dyskusji lub we wstępie albo choćby w metodyce. Doktorant nie odniósł się szerzej do niektórych zjawisk, które zidentyfikował, a które są sygnalizowane w literaturze. Np. w dyskusji wyników uzyskanych u probanta 3 (str. 79) omawiając kwestię niepatogenności wariantów utraty funkcji, przy patogenności wariantów tego samego genu uszkodzonego przez translokację nie odniósł się do literatury. Czy są znane podobne sytuacje?

Wnioski zostały sformułowane w sposób lakoniczny. Wnioski, które znajdujemy w streszczeniu nie odpowiadają treści wniosków w rozdziale „Wnioski” na stronie 85. Wnioski ujęte w streszczeniu nie w pełni odpowiadają celowi pracy. Czy celowi sformułowanemu jako: „*identyfikacja nowych genów/loci, będących przyczyną choroby u objawowych nosicieli de novo BGTs*”, może odpowiadać wniosek „*wykorzystanie sekwencjonowania całogenomowego typu „mate pair” umożliwi ekonomiczną, szybką i precyzyjną identyfikację punktów złamań u pacjentów z BCTs. Dodatkowo, przy de novo BCTs zlokalizowanie punktów złamań niesie ze sobą możliwość diagnozy pacjentów oraz identyfikacji nowych genów/loci będących przyczyną choroby u objawowych nosicieli de novo BCTs.*” Takie sformułowanie byłoby odpowiednie, jeśli celem głównym pracy byłoby sprawdzenie metody, a niejako tylko przy okazji Doktorant wykazałby, że nowe geny/loci dały się zbadać. *Nota bene* to drugie

zdanie nie jest również odpowiedzią na główne pytanie zadane w pracy (cel), tę odpowiedź częściowo znajdujemy na str. 85, gdzie w rozdziale „Wnioski” Doktorant pisze „Zidentyfikowano potencjalnie sprawcze dla fenotypu geny dotychczas nie powiązane z żadną chorobą człowieka: *EFNA5*, *BAHD1*, *PPP2R5E* (bezpośrednio uszkodzone przez translokacje) oraz *DKK2* (o podwyższonej ekspresji prawdopodobnie spowodowanej przez efekt pozycji wywołany przez BCTs).

*Dodatkowo badania pozwoliły na poszerzenie wiedzy na temat chorób wywoływanych przez defekty *NAA15*, *SLC6A1*, *SLC4A10*, *RET*, *TRPS1*, *EBF3*, *LARGE*, *ZNF423* oraz *NIPBL*.”*

Pierwszy z przytoczonych wyżej wniosków jest raczej rekapitulacją wyników, a wniosek powinien wskazywać co z tego wynika (w tym przypadku jest to kwestia sformułowania). Jest to niestety błąd często spotykany. Drugi wniosek jest moim zdaniem zbyt ogólnikowy, rozważania dotyczące tej „poszerzonej wiedzy” powinny być znaleźć się w dyskusji.

Rozprawa doktorska zawiera 107 numerowanych pozycji **piśmiennictwa**, uporządkowanych w kolejności cytowania. Cytowania są poprawne, współczesne, a przytaczane stwierdzenia są dobrze uzasadnione cytowanymi pozycjami piśmiennictwa. Jedyna drobna uwaga dotyczy niepełnych danych bibliograficznych książki cytowanej w pozycji 11 oraz pracy dyplomowej cytowanej w pozycji 48. .

Streszczenie w języku polskim klarownie i zwięźle przedstawia najważniejsze przesłanki, materiał i metody oraz wyniki. Komentarz do wniosków został już wyżej zaprezentowany.

Streszczenie w języku angielskim odzwierciedla treści zawarte w streszczeniu polskim, jest poprawne językowo.

Oceniając **poprawność redakcyjną** rozprawy należy podkreślić, że jest ona przejrzysta pod względem formy, ryciny przedstawiające wyniki są bardzo dobrze opracowane. Niestety Doktorant nie ustrzegł się błędów edytorskich, językowych i interpunkcyjnych, występują też wyrażenia żargonowe i anglicyzmy, np.:


- „pacjentem jest dziewczynka z pierwszej ciąży, urodzona w 40 tygodniu od zdrowych rodziców”
- „**Kamienie milowe** rozwoju u pacjentki były **opóźnione**” (str. 34)
- „zidentyfikowano geny **kandydatów**” (str. 18)
- „w ciągu ostatniej dekady doszło do powstania nowego nurtu w biologii molekularnej” (str. 20)
- „w układzie **in cis/trans**” powinno być: <<w układzie *cis/trans*>>
- „ulegają transkrypcji z początku końca 5” str. 79
- „wykonano **WES**, który nie ujawnił”, powinno być: <<wykonano WES, które nie ujawniło>>
- „**Topologically associating domain**” zostało w spisie skrótów przetłumaczone jako „**Topologicznie wiążące domeny**”, a powinno być: <<domeny powiązane/związane topologicznie>>
- w opisie hodowli fibroblastów Doktorant pisze „...do poziomu 80-90% **zrastania się**”, powinno być np.: <<..do poziomu 80-90% zarastania powierzchni hodowli>>
- w wynikach za każdym razem Doktorant pisze: „**Ostatecznie** gen ... **został uszkodzony**...” powinno być: <<Ostatecznie ustalono, że>>
- Tytuł tabeli 14 zawiera błąd, gdyż w tabeli przedstawiono dane dotyczące probanta 6 a nie 10. (str. 63). Tabela ta zawiera również błąd w opisie rubryk. Doktorant pisze: „**Warianty**”

o prawdopodobnym dziedziczeniu autosomalnym recesywnym” (lub dominującym) a to nie warianty a geny dziedziczą się w określony sposób. Powinno być: „Warianty genów o prawdopodobnym dziedziczeniu ...”

- „nowotwory dziedziczne” (str. 80), powinni być <<nowotwory uwarunkowane dziedzicznie>>
- brak spacji przed określeniami miar „kg”, „cm”
- brak spisu tabel
- liczne błędy literowe.

Reasumując, rozprawa doktorska mgr. Victora Murcii Pienkowskiego prezentuje wyniki badań wpisujących się w bardzo aktualny i ważny nurt poszukiwania zmian genetycznych warunkujących obserwowane objawy kliniczne. Badania zostały zaplanowane, przeprowadzone i zinterpretowane prawidłowo. Zastrzeżenia dotyczą przede wszystkim niepełnej analizy wyników na tle danych literaturowych i braku podniesienia kwestii złożoności kształtowania fenotypu i wynikających stąd problemów w identyfikowaniu przyczyn choroby, sposobu przedstawienia wniosków oraz strony redakcyjnej. Doktorant będzie miał okazję uzupełnić te braki podczas obrony. Należy jednak podkreślić, że uwagi krytyczne nie wpływają na zasadniczo pozytywną ocenę pracy bowiem Doktorant wykazał się wiedzą teoretyczną, dobrym warsztatem badawczym i umiejętnością prowadzenia badań naukowych, zrealizował cel pracy i przedstawił oryginalne dane, które zostały już częściowo opublikowane w czasopiśmie o wysokiej renomie.

W związku z powyższym stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art 13 Ustawy z dn. 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (DzU. nr 65, poz.595 z późn. zm.) w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dn. 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające Ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (DzU. z 2018 r. poz. 1669 z późn. zm.) i zwracam się do wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego z wnioskiem o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr. Victora Murcii Pienkowskiego do dalszych etapów postępowania doktorskiego.


KIEROWNIK
ZAKŁADU IMMUNOLOGII
dr hab. n. med. Magdalena Chechińska
Prof. Instytutu
ZAKŁAD IMMUNOLOGII
Narodowego Instytutu Onkologii
im. Marii Skłodowskiej-Curie -
Państwowego Instytutu Badawczego
ul. W. K. Roentgena 5, 02-781 Warszawa