


Akceptuję


Prof. dr hab. Jacek Zaremba
Zakład Genetyki
Instytut Psychiatrii i Neurologii
ul. Sobieskiego 9, 02-957 Warszawa

Warszawa 15.07.2023

Ocena rozprawy doktorskiej na stopień doktora nauk medycznych mgr Anny Walczak

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Rafał Płoski

Promotor pomocniczy: dr n. med. Małgorzata Rydzanicz Zakład Genetyki Medycznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny.

Tytuł rozprawy: Punktowe mutacje postzygotyczne w diagnostyce i poradnictwie genetycznym.

Mozaikowość określa się jako obecność u danego osobnika dwóch lub większej liczby linii komórkowych różniących się składem chromosomów lub mutacji (wariantów) w poszczególnych genach pochodzących z tej samej zygoty. Natomiast chimeryzm występuje wówczas, gdy komórki danego osobnika pochodzą z dwóch różnych zygot.

Temat recenzowanej rozprawy dotyczy poszukiwania punktowych mutacji/wariantów postzygotycznych.

Autorka rozprawy wyróżnia trzy typy mozaikowości: somatyczną, gonosomalną i germinálną.

Mozaikowość somatyczna oznacza wystąpienie wariantu postzygotycznego po różnicowaniu się pierwotnych komórek somatycznych i komórek płciowych. W związku z brakiem tego wariantu w komórkach płciowych nie może on być dziedziczony tzn. przekazany następnemu pokoleniu. Dobrym przykładem jest wystąpienie wariantu somatycznego u jednego z bliźniąt monozygotycznych. Przypadek taki został zidentyfikowany i opisany w ZGM WUM (40).

Natomiast mozaikowość gonosomalną obserwujemy wówczas, gdy mutacja/wariant wystąpi w stadium embriogenezy przed podziałem na komórki somatyczne i płciowe. Możliwe jest zatem przekazanie tego wariantu na następne pokolenie.

Wreszcie mozaikowość germinálna występuje tylko w pewnym odsetku komórek gonad, a więc nie stwierdza się danego wariantu w DNA wyizolowanym z komórek krwi obwodowej, natomiast niekiedy stwierdza się go u członków tego samego rodzeństwa.

Autorka rozprawy słusznie podkreśla, że warianty somatyczne odgrywają bardzo ważną rolę w patogenezie chorób nowotworowych, co jednak nie stanowi przedmiotu jej rozprawy.

Materiał, z którego izolowany jest DNA powinien odpowiadać każdemu z trzech listków zarodkowych: mezodermy – komórki krwi obwodowej i ślina, ektodermy – wymaz z błony śluzowej policzka i/lub cebulek włosów, entodermy - komórki pochodzące ze ściany pęcherza moczowego obecne w osadzie moczu. Metody analiz genetycznych, którymi posługiwała się Autorka to NGS, a w szczególności ADS – ultragłębokie

sekwencjonowanie amplikonów służące precyzyjnej ocenie odsetka sekwencji badanych wariantów oraz sekwencjonowanie Sangera służące potwierdzeniu obecności badanych wariantów. “Wszystkie opisane działania” jak pisze Autorka pracy “prowadzą do znalezienia tego jednego z ponad trzech miliardów nukleotydów, który uznamy za prawdopodobną przyczynę fenotypu badanego pacjenta”.

I to właśnie wiąże się z głównym celem tej pracy.

A cele swojej pracy Autorka formułuje następująco:

1. Wyznaczenie najniższej wartości VAF (variant allele frequency) dla wariantu istotnego klinicznie występującego w DNA z krwi badanego/probanta.
2. Ocenę częstości mozaikowości germinalnej lub gonosomatycznej wśród, odpowiednio ojców i matek dzieci, u których na podstawie badania DNA z krwi stwierdzono wariant potencjalnie powstały de novo powodujący chorobę.
3. Wyznaczenie najwyższej wartości VAF w DNA z krwi u jednego z bezobjawowych rodziców dla wariantu sprawczego, odziedziczonego przez probanta.
4. Określenie zasad poradnictwa genetycznego.
5. Zaproponowanie dalszego postępowania diagnostycznego z wykorzystaniem badań opartych o metodę NGS dla rodzin z potencjalnie istotnym klinicznie wariantem de novo.
6. Podjęcie próby oceny zależności genotypowo-fenotypowej wytypowanych zmian.

Trzy pierwsze z wymienionych wyżej celów określa Autorka jako główne.

Materiał do badań stanowił DNA izolowany z tkanek pochodzących z trzech różnych listków zarodkowych (jak wyżej), ale głównie z krwi. W ograniczonej liczbie przypadków DNA izolowano z fibroblastów skóry, z cebulek włosów, a nawet z biopsji mózgu (jeden przypadek).

Do grupy badanej zakwalifikowano 55 rodzin: niespokrewnieni rodzice i probant.

Grupę badaną podzielono na dwie kategorie: pierwsza – 10 rodzin – patogenny i zgodny z fenotypem probanta wariant z VAF < 40% ; druga – 45 rodzin – patogenny wariant występujący u probanta w układzie heterozygotycznym, podczas gdy w DNA z krwi rodziców obecność tego wariantu wykluczono u obojga, bądź też wykryto go u jednego z rodziców w odsetku <40%.

Fenotyp probantów jest przedstawiony na Ryc 3: wyróżniono 17 jednostek chorobowych. Najczęściej była to padaczka i opóźnienie w rozwoju psychoruchowym. Rzadziej były to różne typy dysmorfii, gładkomózgowia i szerokozakrętowość, wada serca i wrodzone nietrzymanie barwnika. Sekwencjonowanie całego eksomu metodą NGS wykonano u każdego probanta lub w tzw układzie TRIO – u probanta i rodziców z użyciem kilku dostępnych zestawów różnych firm.

Następnie przeprowadzono analizę bioinformatyczną uzyskanych wyników sekwencjonowania.

Warianty wytypowane w WES weryfikowano metodą Sangera. Reakcją PCR posłużono się w celu uzyskania amplikonów stosowanych w metodzie Sangera i ADS. Stosowana metodologia badań molekularnych opisana jest bardzo szczegółowo i kompetentnie w tekście głównym rozprawy i w suplemencie.

Wyniki swoich badań Autorka podzieliła na 4 grupy:

1. Wariant postzygotyczny obecny u probanta (10 osób)

2. Wariant postzygotyczny obecny u rodzica (13 osób) w tkankach somatycznych (mozaikowość gonosomalna)
3. Wariant postzygotyczny obecny w nasieniu ojca probanta (mozaikowość germinalna (4 osoby)
4. Potencjalny wariant de novo germinalny (28 osób)

W tabeli 1 Autorka zestawiała geny, w których wykryto warianty, liczbę i fenotypy probantów – 18 pozycji.

Przykładowo:

Gen PIK3CA – sześciu probantów, fenotyp MCAP-like (Megalencephaly – capillary malformation – polymicrogyria syndrome). Pięć wariantów wykrytych we krwi probantów, przedział VAF wynosił od 3% do 18%. U dwóch probantów analizowane warianty nie były obecne we krwi, lecz stwierdzono ich obecność w fibroblastach i cebulkach włosów, gen PAFAH1B1 – dwóch probantów, fenotyp gładkomózgowie i szerokokąćtość.

Powiązanie wymienionych w tabeli 1 licznych genów, jak dwa wyżej wymienione, z jednostkami chorobowymi na podstawie katalogu OMIM przedstawiono w Suplemencie (Tabela 52).

Najważniejsze i najniższe wartości VAF na podstawie uzyskanych wyników analiz Autorka przedstawiła w Tabeli 11.

W dyskusji Autorka omawia szeroko uzyskane własne wyniki badań, nawiązując do licznych publikacji poświęconych tej problematyce.

M.in. Autorka przytacza fakt, że warianty w postaci gonosomalnej częściej zwiększają ryzyko nawrotu niż warianty ograniczone do linii zarodkowej.

Dane literaturowe wskazują, że tempo nowych mutacji dotyczących pojedynczego nukleotydu jest niższe u płci żeńskiej, ale z drugiej strony wystąpienia mozaikowości germinalnej u matki wiąże się z ryzykiem nawrotu u kolejnego dziecka 3-4 krotnie większym niż w sytuacji, gdy patologiczny wariant występuje w komórkach płciowych ojca. Chociaż prawdopodobieństwo wystąpienia nowego wariantu w komórkach płciowych ojca jest większe i rośnie z jego wiekiem. Fakt zależności nowych mutacji niektórych chorób genetycznych od zaawansowanego wieku ojca znany był już od dawna.

Autorka rozprawy oddzielny, bardzo ciekawy rozdział w dyskusji poświęca poradnictwu genetycznemu – bo taki jest zresztą jeden z głównych celów badań prowadzonych przez nią w ZGM WUM. W odniesieniu do ryzyka nawrotu podkreśla konieczność zbadania innych tkanek jeśli wykluczona jest obecność poszukiwanego wariantu we krwi rodzica.

“Kompleksowe podejście diagnostyczne” w takich przypadkach może przyczynić się do “świadomego planowania rodziny, wdrożenia badań prenatalnych czy przedimplantacyjnych”.

Końcowy podrozdział dyskusji zatytułowany jest “Kierunki na przyszłość” z perspektywą skrócenia czasu i zmniejszenie kosztów sekwencjonowania i analizy danych.

W tym miejscu Autorka powołuje się na niedawną publikację Wasilewskiej i wsp. (18).

Ostatni rozdział zawiera bardzo dobrze uzasadnione wnioski odpowiadające ściśle celom rozprawy.

Trzy “wnioski główne” Autorki są następujące:

1. Najniższa wartość VAF dla wariantu istotnego klinicznie (zespół MCAP) wynosiła 3% w genie PIK3CA.
2. Częstość ojcowskiej mozaikowości germinalnej potencjalnie patogennych wariantów, które u chorego dziecka uznano za sprawcze, ustalono na poziomie 13% (4/30 badanych próbek nasienia), a częstość mozaikowości gonosomalnej matek wynosiła 9% (4/44 badanych kobiet).
3. Najwyższa wyznaczona wartość VAF dla wariantu sprawczego, odziedziczonego przez probanta, u bezobjawowego rodzica wynosiła 35% dla wariantu zidentyfikowanego w genie GATAD2B.

Trzy pozostałe wnioski dotyczą: poradnictwa genetycznego (4) postępowania diagnostycznego (5) i zależności genotypowo-fenotypowych (6).

Szczególnie ważny praktycznie wniosek, moim zdaniem, stanowi identyfikacja genów, które “wydają się być podatne na częste występowanie wariantów postzygotycznych u rodziców i probantów, a są to KIF1A, COL2A1, SCN1A I GATAD2B.

Praca doktorska mgr Anny Walczak ma układ klasyczny, przygotowana jest bardzo starannie i napisana dobrą polszczyzną. Tekst liczy 103 strony, zawiera 9 bardzo dobrych rycin, 12 bardzo dobrze skonstruowanych tabel. Lista piśmiennictwa liczy 137 pozycji – w tym wiele najnowszych.

W pogładowym, bardzo dobrym wstępie i w dyskusji mgr A. Walczak daje wyraz swojej gruntownej wiedzy na temat przedmiotu rozprawy, interpretuje wyniki swoich badań poprawnie.

Szczególnym walorem pracy jest zastosowanie najnowocześniejszych metod badań molekularnych i biegłość doktorantki w tym zakresie. Nie mam w stosunku do pracy żadnych uwag krytycznych natury merytorycznej.

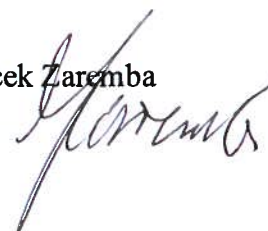
Poza niewątpliwą wartością poznawczą praca zawiera szereg elementów aplikacyjnych – zwłaszcza dotyczących diagnostyki chorób genetycznych i poradnictwa genetycznego.

Mam zatem pełne podstawy by stwierdzić, że rozprawa doktorska mgr Anny Walczak spełnia wszelkie kryteria ustawowe stawiane rozprawom na stopień doktora nauk medycznych w dyscyplinie nauki medyczne, a ściśle biorąc rozprawa doktorska mgr Anny Walczak 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).

Ponadto biorąc pod uwagę szczególne walory tej wybitnej rozprawy, którą scharakteryzowałem powyżej */ stawiam wniosek o jej wyróżnienie.

Jacek Zaremba



*/ patrz powyższy akapit począwszy od: Szczególnym walorem pracy ...