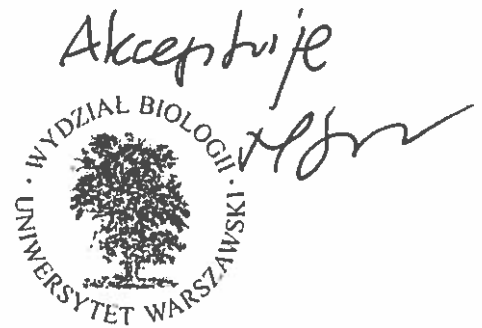




UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii
Instytut Genetyki i Biotechnologii
prof. dr hab. Katarzyna Tońska



Warszawa, 29.06.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Walczak pt.: „Punktowe mutacje postzygotyczne w diagnostyce i poradnictwie genetycznym”.

Sytuacja, w której do poradni genetycznej zgłasza się para zdrowych dorosłych z chorym dzieckiem jest zapewne jedną z najczęstszych. W ciągu ostatnich kilkunastu lat spojrzenie genetyka na taką rodzinę bardzo się zmieniło. Nieco upraszczając, punktem wyjścia w poradnictwie genetycznym było w takim przypadku dziedziczenie autosomalne recesywne. Z czasem okazało się, że istotną część takich rodzin stanowią przypadki dziedziczenia autosomalnego dominującego z mutacją *de novo*. To wciąż mało, pozostawało bowiem pytanie, co kryje się za mutacją *de novo*: u kogo zaszła? na jakim etapie rozwoju? w jakiej części komórek? A co za tym idzie, jakie jest ryzyko ponownej choroby w rodzinie?

Z zagadnieniem mutacji *de novo* nieodłącznie wiąże się problem mozaikowatości będącej jej wynikiem i możliwości ilościowego jej określania, które nie było precyzyjne przy zastosowaniu sekwencjonowania metodą Sangera. Wprowadzenie technik sekwencjonowania wysokoprzepustowego pozwoliło nie tylko na szybkie i całościowe spojrzenie na genom człowieka (czy jego wybraną część), ale także umożliwiło ilościowe oszacowanie obecności wariantu.

Wykorzystując właśnie techniki sekwencjonowania wysokoprzepustowego, uzupełnione innymi metodami diagnostyki molekularnej, mgr Anna Walczak przeprowadziła kompleksową analizę mozaikowatości wynikającą z nowych mutacji, które zaszły bądź u probanta bądź u jednego z jego rodziców.

Przedstawiona do recenzji praca liczy 103 strony i ma układ klasyczny, uzupełniona jest o spisy tabel i rycin, a także suplement.

Wstęp znakomicie wprowadza w problematykę badawczą pracy przybliżając zjawisko mutacji *de novo* i wprowadzając podział takich wariantów w zależności od tego, czy pojawiają się u probanta, czy też u rodzica oraz czy dotyczą komórek somatycznych, germinalnych czy też jednych i drugich, a także zapoznaje nas z metodologią niezbędną do stwierdzenia obecności takich zmian, oraz trudnościami jakie się z tym wiążą. Na samym końcu autorka pisze o standardach w diagnostyce genetycznej z wykorzystaniem NGS i zwraca uwagę na brak lub niekompletność rekomendacji krajowych (całkowity brak) i europejskich (niekompletność). Czy z pomocą mogą przyjść rekomendacje amerykańskie? Czy obejmują one problematykę zmian postzygotycznych?

Autorka dzieli postawione sobie cele na główne i dodatkowe. Szczerze mówiąc wzdrgam się przed określeniem celów 4 - 6 jako dodatkowe. Uważam, że badania mgr Anny Walczak właśnie do nich powinny prowadzić i prowadzą, a realizacja celów 1-3 stanowi środek do ich osiągnięcia. Zapewne jest tak dlatego, że autorka patrzy na nie przez pryzmat konkretnych wariantów i konkretnych badanych przez siebie rodzin, podczas gdy uzyskane wyniki mogą prowadzić do bardziej uniwersalnych wniosków.

Rozdział materiały i metody pokazuje świetnie jak złożona była problematyka badania i jak, w przypadku wielu rodzin należało dopasować podejście badawcze do konkretnego przypadku: wykorzystać inną tkankę niż wcześniej badana, konkretny panel genów oprócz wcześniej przeprowadzonego sekwencjonowania eksomowego itp. Wybrane metody uważam za jak najbardziej adekwatne i dobrze opisane, a cały rozdział za kompletny.

Wyniki stanowią najobszerniejszą część pracy, co nie dziwi ze względu na wielość prowadzonych badań. 55 probantów zostało przypisanych do czterech grup zależnie od tego, czy mamy do czynienia z mozaikowością i jakiego jest ona rodzaju (choć o podziale czytelnik jest informowany już po tym, jak w pierwszym akapicie Wyników pojawia się odniesienie do grupy 1 i 3). Następnie szczegółowo omawiane są wyniki uzyskane dla kolejnych grup. Dla każdej z grup autorka podaje wyniki zbiorcze w formie tabelarycznej, oraz dodatkowo, na wybranym przykładzie przedstawia wyniki poszczególnych badań, co pozwala na zapoznanie się z warsztatem badawczym. W znaczącej większości wyniki są dobrze, czytelnie opisane i zanalizowane, autorka nie ustrzegła się jednak błędów, które wprowadzają pewien zamęt. Na przykład na stronie 52 znajduje się informacja, że w genie *KIF1A* znaleziono cztery nieopisane wcześniej warianty, a w

odnośnej tabeli figurują jedynie dwa. W tabeli 7 podsumowującej warianty genu *SCN1A* znajduje się 14 wariantów, z czego 3 oznaczone, jako badane w rozprawie, co jest niezgodne z tabelą 3, w której opisano dwa warianty (p.Arg1625Gln, p.Glu1795Ter), z których drugi nie figuruje w tabeli 7. W tabeli 7 zaś pojawia się, jako wariant badany w pracy: p.Ala1658Thr. Jak rozumiem, jako trzeci wariant badany (w Tabeli 7) uznany został wariant p.Trp384Ter, dla którego określono udział wariantu we krwi i wymazie błony śluzowej policzka.

Odnosnie do rozdziału Wyniki mam jeszcze dwa pytania. Jedno dotyczy tego, jaki sposób określono, że próg detekcji dla ADS wynosi 1%? Drugie zaś, bardziej zahaczające o dyskusję to, czy jest jakiś mało kosztowny sposób, który pozwoliłby na poprawę korelacji określenia VAF pomiędzy WES i ADS (w jednym z opisywanych przypadków różnica wynosiła 60% vs. 20%)?

Dyskusja musiała być znacznym wyzwaniem dla doktorantki ze względu na wielość sytuacji klinicznych (różne rozpoznania), diagnostycznych (różnorodność uzyskanych wyników) czy zmienność genetyczną w badanej grupie. Poradziła tobie z tym zadaniem znakomicie. Szczególnie wartościowe wydają mi się propozycje odnośnie zmiany standardów niektórych badań w taki sposób, aby wychwycić przypadki mozaikowatości, a co za tym idzie zwiększyć częstość sukcesu diagnostycznego czy też móc udzielić właściwej porady genetycznej. Dobrym przykładem są tu patogenne warianty *PIK3CA*. Podczas prowadzenia badań genetycznych przywykliśmy do tego, że materiałem do badań jest krew obwodowa, a inne tkanki pobiera się, gdy występują trudności z pobraniem krwi, istnieje potrzeba założenia hodowli komórkowej, potrzebna jest analiza mitochondrialnego DNA. Są to sytuacje relatywnie rzadkie w przypadku podejrzenia choroby o podłożu jądrowym. Badania Anny Walczak potwierdzają to, co już od pewnego czasu jest sugerowane, że w niektórych przypadkach, właśnie ze względu na mozaikowość, krew wcale nie jest najlepszym materiałem do badań. Zastąpić ją powinny inne tkanki, jak na przykład fibroblasty czy cebulki włosowe w przypadku genu *PIK3CA*.

Bardzo ciekawe są także rozważania nad korelacją VAF-fenotyp w przypadku mozaikowości zarówno u probanta jak i u bezobjawowych lub skąpo objawowych rodziców. Wynika z nich, że trudno będzie wypracować jakieś ogólne wytyczne jedynie na podstawie stwierdzenia mozaikowatości, natomiast rysują się pewne prawidłowości dla konkretnych genów czy wariantów genetycznych, jak na przykład brak bezobjawowej mozaikowatości wariantów w genie *SCN8A*, czy też relatywnie częste występowanie pojedynczych napadów padaczkowych u rodziców mozaikowych pod względem patogennych wariantów genu *SCN1A*. Ciekawa jestem zdania doktorantki w sprawie proponowania badań genetycznych, właśnie pod kątem patogennych

wariantów genu *SCN1A* (czy też innych związanych z zespołami padaczkowymi) osobom, u których wystąpiły napady padaczkowe niebędące jednak elementem całego zespołu chorobowego?

Dyskusję oceniam bardzo wysoko, jest ona wisienką na torcie tej rozprawy. Uzyskane wyniki pokazuje w szerszym kontekście i proponuje kierunki przyszłych badań mających na celu poprawę algorytmów diagnostycznych, ale także zupełnie podstawowych mogących poszerzyć wiedzę o częstotliwości mutacji na różnych etapach rozwoju osobniczego.

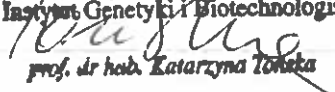
Rozprawę kończą Wnioski, które autorka sformułowała w taki sposób, żeby bezpośrednio odpowiadały na postawione cele. I podobnie jak w przypadku celów, wnioski 4-6 są ważniejsze, a nawet bardzo istotne i lepiej mieszczące się w definicji wniosku niż 1-3 (przy czym 1 i 3 to właściwie konkretne wyniki, a nie wnioski).

Na koniec chciałabym poruszyć kwestię języka pracy i jej formy edytorskiej. Bardzo pozytywnie oceniam sam język pracy i stosowaną nomenklaturę – autorce udaje się uniknąć zbędnych anglicyzmów itp. Nieco gorzej praca „przechodzi” ocenę edytorską. Jest w niej relatywnie dużo literówek i błędów będących zapewne wynikiem nanoszenia kolejnych poprawek (np. na str. 41 „Wszystkie warianty obecne w tej grupie nie zostały znalezione w bazie gnomAD...” zamiast „Żadne warianty... nie zostały znalezione...”).

Powyższe uwagi mają jedynie charakter kronikarski i nie wpływają na odbiór pracy, która porusza bardzo istotne bieżące problemy diagnostyki chorób genetycznych, wiele wnosi do tej dziedziny i może stanowić podstawę do tworzenia nowych wytycznych postępowania w przypadku niektórych rozpoznań.

Stwierdzam, zatem, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa mgr Anny Walczak zatytułowana „Punktowe mutacje postzygotyczne w diagnostyce i poradnictwie genetycznym” stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego i 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 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018r. poz. 1669 z późn. zm.). W związku z powyższym, zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pani mgr Anny Walczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie ze względu na

wysoki poziom merytoryczny pracy i zastosowany warsztat badawczy oraz praktyczne znaczenie uzyskanych wyników wnioskuję o wyróżnienie pracy w przyjęty przez Radę sposób.

Uniwersytet Warszawski
Wydział Biologii
Instytut Genetyki i Biotechnologii

prof. dr hab. Katarzyna Toka

