



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ

im. Ludwika Hirsztfelda

POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości: IMMUNE

ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław

tel. (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 fax: (+48-71) 337 21 71

<http://www.iitd.pan.wroc.pl>

W dni 28.09.2015

M. Paolmoshnech

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
DZIEKANAT WYDZIAŁU LEKARSKIEGO

wpt. dn. 11 WRZ. 2015

L.dz. DL/ 3112/15  
Znak sprawy DL-

Wrocław, 8.09.2015 r.

## Ocena

### rozprawy doktorskiej lek. Anny Błońskiej z Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu pt. „Genetyczne modyfikatory fenotypu kardiologicznego zespołu delecji 22q11”

Niezwykle dynamiczny rozwój nowych badań genetycznych przyczynia się do głębszego poznania zaburzeń genetycznych prowadzących do rozwoju szeregu schorzeń. Wyniki tych badań mogą być wykorzystane w próbach spersonalizowanych terapii.

#### Cel projektu

Doktorantka podjęła oryginalne badania nad genetycznymi modyfikatorami fenotypu kardiologicznego zespołu delecji 22q11. Zespół ten występuje bardzo rzadko i zebranie reprezentatywnej grupy chorych wymaga dobrze zorganizowanej, wielośrodkowej współpracy zarówno w aspekcie uzyskania danych klinicznych jak i uzyskania wystarczającej ilości DNA do przeprowadzenia badań. Lek Anna Błońska przeprowadziła te badania na Wydziale Genetyki Molekularnej Albert Einstein College of Medicine Uniwersytetu Yeshiva w Nowym Jorku.

W obszarze zainteresowań Doktorantki był gen *TBX1*, który w badaniach na myszach został w literaturze wytypowany jako kluczowy gen kandydat dla wad serca w 22Q11DS. Badania przeprowadzono na drugiej kopii genu *TBX1* oraz w całym genomie. W celu weryfikacji hipotezy badawczej podjęto następujące badania:

1. dla wykluczenia wpływu wielkości delecji przeprowadzono badania określające wielkość delecji regionu 22q11 w badanej grupie pacjentów. Celem było uzyskanie homogennej co do rozmiaru delecji grupy;
2. w celu weryfikacji hipotezy o istnieniu modyfikatorów genetycznych w drugiej (nie ulegającej delecji) kopii genu *TBX1* Doktorantka dokonała jego resekwencjonowania i poszukiwała ich w odtworzonej sekwencji;

3. w celu weryfikacji hipotezy o istnieniu modyfikatorów genetycznych w pozostałych częściach genomu Doktorantka przeprowadziła genotypowanie za pomocą macierzy całogenomowych.

Lek. Anna Błońska poprawie sformułowała problemy i założenia badawcze pracy.

Wstęp rozprawy doktorskiej jest obszerny i zawiera szereg podrozdziałów. We Wstępie Doktorantka przedstawia rys historyczny odkrycia zespołu delecji 22q11. Kolejno omawia jego definicje i inne nazwy zespołu. Osobny podrozdział poświęcony jest charakterystyce klinicznej zespołu delecji 22q11. Szczególnie dokładnie omawia cechy dysmorficzne twarzoczaszki, zaburzenia dotyczące narządu wzroku, zaburzenia narządu słuchu i budowy uszu, zaburzenia budowy nosa; szczególnie dokładnie omawia wady serca i naczyń odchodzących od serca oraz inne nieprawidłowości naczyniowe. Kolejno przedstawia zaburzenia neurologiczne, nieprawidłowości struktur gardła, tchawicy i dróg oddechowych, zaburzenia narządów wewnętrznych jamy brzusznej i nerek, wady kończyn, problemy w niemowlęctwie, zaburzenia mowy, zaburzenia poznawcze, zaburzenia psychiatryczne i psychologiczne, niedobory odpornościowe, zaburzenia endokrynologiczne, ortopedyczne.

Ponadto omawia zespoły drugorzędowe związane z tym zespołem. Kolejny podrozdział poświęcony jest etiologii, podstawom embriologicznym, genetycznym i molekularnym tego zespołu. W tym podrozdziale omawia:

1. rozmiar i mechanizm powstawania delecji,
2. gen *TBX1* jako naczelnny gen kandydat odpowiedzialny za główne cechy zespołu
3. inne geny odpowiedzialne za niektóre cechy zespołu.

Kolejno omawia diagnostykę zespołu delecji 22q11, w tym:

1. diagnostykę kliniczną
2. diagnostykę cytogenetyczną i molekularną.

Ostatni podrozdział poświęcony jest omówieniu potencjalnych genetycznych i pozagenetycznych modyfikatorów fenotypu zespołu delecji 22q11.

Wstęp może stanowić ciekawą rozprawę poglądową.

Całość Wstępu napisana jest rzeczowo i przejrzysto. Wstęp stanowi bardzo dobre, w pełni wyczerpujące wprowadzenie do badań własnych Doktorantki.

## **Material i metody**

Do badania włączono DNA 438 pacjentów rasy kaukaskiej z potwierdzoną uprzednio za pomocą badania FISH obecnością delecji regionie 22q11.2 udokumentowaną za pomocą badania

FISH z użyciem fluorescencyjnej sondy TUPLE 1 lub N25. Spośród pacjentów z delecją do dalszych analiz Doktorantka włączyła jedynie tych, u których ustaliła rozmiar delecji jako 3MB.

Projekt przeprowadzono trójetapowo:

- w pierwszym etapie ustalono rozmiar delecji przy użyciu markerów mikrosatelitarnych (z ang. microsatellite markers lub short tandem repeats, STR) oraz metody MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification). Do dalszych etapów wyselekcjonowano tylko DNA pacjentów z rozmiarem delecji 3MB.

- w drugim etapie przeprowadzono resekwencjonowanie drugiej kopii genu *TBX1* u 370 chorych pacjentów i analizę powiązań otrzymanych polimorfizmów pojedynczych par nukleotydów (single nucleotide polymorphisms, SNP) z ich fenotypem kardiologicznym.

- w trzecim etapie wykorzystano macierz Affymetrix Genome-Wide Human SNP Nsp/Sty 6.0 do analizy SNP w całym genomie. Przeprowadzono badanie asocjacyjne całego genomu (GWAS) i analizowano powiązania znalezionych SNP w oparciu o dwa ekstrema fenotypu – u pacjentów z najcięższą wadą serca – tetralogią Falota oraz u pacjentów bez wady serca.

Metody badawcze są adekwatne do przeprowadzenia zaplanowanych badań.

Wszystkie metody badawcze zostały opisane bardzo szczegółowo. Zwraca uwagę nowoczesna metodologia. Cały dział obrazuje ogrom pracy, który Doktorantka musiała włożyć podczas wykonywania swoich badań oraz wskazuje na bardzo wysoki poziom warsztatu badawczego, w którym praca ta została wykonana. Wyniki pracy zostały opracowane starannie i jasno przedstawione w postaci tabelarycznej oraz na rycinach.

## Wyniki

W wyniku genotypowania pacjentów za pomocą obu metod STR i MPLA u ponad 90% (n = 407) pacjentów wykryto rozmiar delecji 3MB. U pozostałych pacjentów występowała delecja wielkości 1.5 MB, a u bardzo niewielkiej grupy między 1.5 a 3 MB. Analiza polimorfizmów SNP na drugiej kopii genu *TBX1* początkowo wykazała powiązania 6 SNP z ubytkiem przegrody międzyprzedsionkowej i 2 SNP z ubytkiem przegrody międzykomorowej, jednak po korekcji dla wielokrotnych testów okazały się one nieistotne statystycznie.

Badanie GWAS na platformie Affy 6.0 wykryło interesujące powiązania między SNP obecnymi w genach mających wpływ na rozwój układu sercowo-naczyniowego, tj. VEGF, ANGPT2 i HAS2, a ekstremami fenotypu kardiologicznego podczas wstępnej analizy na grupie 41 pacjentów.

Powiązania te jednak nie zostały potwierdzone na większej grupie (n=121) pacjentów, u której istotne statystycznie wyniki uzyskano tylko dla 15 SNP na chromosomie 13. Polimorfizmy te jednak nie występowały w obszarze żadnych genów i w oparciu o dostępną literaturę nie znaleziono wytłumaczenia dla ich potencjalnej roli w rozwoju układu sercowo-naczyniowego.

## Dyskusja

W Dyskusji Autorka wykazała, że jest świetnie obeznana z piśmiennictwem, które jest aktualne i starannie dobrane oraz, co godne podkreślenia, potrafi interpretować własne wyniki w świetle innych doniesień. Dyskusja jest obszerna i wyczerpująca. Całość Rozprawy kończą trzy wnioski, które znajdują odzwierciedlenie w przeprowadzonych badaniach własnych.

## Wnioski

Reasumując uważam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska lek. Anny Błońskiej ma charakter poznawczy i duże implikacje kliniczne. Zakres wykonanych badań znacznie przekracza wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Praca ta posiada prawidłowy układ i struktury podziału treści. Uzyskane wyniki mają oryginalny charakter i stanowią podstawę do dalszych badań laboratoryjnych i klinicznych. Autorka wykazała szeroką wiedzę teoretyczną oraz opanowanie nowoczesnych, skomplikowanych technik laboratoryjnych. Ze względu na bardzo wysoki poziom naukowy przeprowadzonych badań, niezwykle staranną redakcję pracy mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej we Wrocławiu wysoce pozytywną recenzję pracy z wnioskiem o dopuszczenie lek. Anny Błońskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz o wyróżnienie tej rozprawy.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 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.).

prof. dr hab. Irena Frydecka  
specj. chorób wewnętrznych  
i hematologii  
51-602 Wrocław, ul. Koczanowskiego 3  
tel. 661317832 8621490 980114523

Prof. dr hab. Irena Frydecka