

Recenzja rozprawy doktorskiej
magistra biotechnologii Jakuba Fichny
pt.: „Identyfikacja i kompleksowa charakterystyka podłoża genetycznego rzadkich miopatii i dystrofii
mięśniowych w populacji polskiej”

Promotor pracy: prof. dr hab. Cezary Żekanowski

Dystrofie obręczowo-kończynowe (LGMD) oraz miopatie miofibrylarne (MFM) stanowią niejednorodne klinicznie i genetycznie grupy rzadkich schorzeń mięśni o nakładających się fenotypach. Pomimo trwających od blisko dwudziestu lat badań podłoża genetyczne tych chorób jest tylko w części poznane. Heterogenność molekularna jak i kliniczna są powodem ogromnych trudności diagnostycznych tych schorzeń gdyż te same objawy kliniczne mogą być efektem mutacji w różnych genach, z drugiej strony mutacje w tym samym genie mogą spowodować wystąpienie różnych objawów klinicznych w zależności od typu czy lokalizacji mutacji. Przykłady takiej różnorodności fenotypowej mogą dodatkowo sugerować oddziaływanie innych modyfikujących czynników, wpływających na ekspresję mutacji w niektórych genach odpowiedzialnych za LGMD czy MFM.

Brak objawów patognomonicznych lub specyficznych markerów biochemicznych oraz częste nakładanie się fenotypów z innymi postaciami miopatii często powodują, że rozpoznanie kliniczne LGMD i MFM oraz ich różnicowanie jest trudne, a potwierdzenie molekularne kosztowne. Często badania genetyczne są poprzedzone badaniem białek w celu zawężenia zakresu badań molekularnych. W praktyce klinicznej, konwencjonalne sekwencjonowanie dużej liczby genów krok po kroku to proces czasochłonny i kosztowny. W związku z tym klinicyści i pacjenci często zaprzestają dalszych badań bez uzyskania diagnozy.

Pojawienie się wielkoskalowych metod wysokoprzepustowych wraz z zaawansowaną analizą bioinformatyczną, umożliwiającą wykrywanie wariantów genetycznych w skali całego eksomu lub genomu, spowodowało wzrost skuteczności diagnostyki molekularnej wielu chorób. Zastosowanie sekwencjonowania nowej generacji w diagnostyce miopatii umożliwia zarówno określenie mutacji sprawczych w znanych genach, jak i zapewnia dodatkową możliwość identyfikacji nowych genów związanych z chorobą. Należy podkreślić, że wraz z wprowadzeniem metod sekwencjonowania nowej generacji skuteczność identyfikacji mutacji sprawczej u pacjentów z miopatiami wzrosła niemal dwukrotnie, z 20-40% do 40-60%.

W Polsce nie przeprowadzono dotychczas badań zmierzających do poznania podłoża genetycznego u pacjentów z klinicznym rozpoznaniem rzadkich miopatii LGMD i MFM. Podjęte, zatem przez Doktoranta badania wydają się być w pełni uzasadnione, zarówno ze względów poznawczych jak i z punktu widzenia praktyki klinicznej.

Układ przedstawionej do recenzji rozprawy jest typowy i składa się ze wstępu wprowadzającego w problematykę pracy, celów pracy, opisu grup badanych i zastosowanych metod, przedstawienia wyników oraz ich omówienia, podsumowania, wniosków, streszczenia w języku polskim i angielskim, spisu tabel i rycin, oraz wykazu piśmiennictwa. Na początku pracy przed rozdziałem *Wstęp* umieszczono wykaz stosowanych skrótów, a na końcu pracy w rozdziale *Uzupełnienie* przedstawiono klasyfikację dystrofii obręczowo-kończynowych oraz miopatii miofibrylarnych wraz z krótką charakterystyką kliniczną poszczególnych podtypów. Rozprawa obejmuje 74 strony wydruku, zawiera 6 rycin oraz 9 tabel. Cytowane piśmiennictwo, zawierające także najnowsze prace dotyczące tematu rozprawy, obejmuje 161 pozycji. Układ pracy jest czytelny z podziałem na podrozdziały ułatwiające zrozumienie trudnych i szczegółowych zagadnień bioinformatycznych i molekularnych.

W krótkim siedmiostronicowym *Wstępie* Autor w sposób syntetyczny przedstawia aktualny stan wiedzy na temat dystrofii obręczowo-kończynowych oraz miopatii miofibrylarnych – skupiając się na klasyfikacji, podłożu genetycznym oraz diagnostyce różnicowej obu chorób. Doktorant podkreśla trudności diagnostyczne spowodowane heterogennością molekularną i kliniczną oraz nakładaniem się fenotypów

opisywanych miopatii. W końcowej części *Wstępu* omawia możliwości nowoczesnych wielkoskalowych technik wysokoprzepustowych w poprawie skuteczności identyfikacji podłoża genetycznego wyżej wymienionych chorób, szczególnie w przypadkach łagodnych i o niejednoznacznym obrazie klinicznym.

W kolejnym rozdziale Doktorant w oparciu o przesłanki zawarte we *Wstępie* formułuje cele pracy. Podstawowym celem jest próba określenia podłoża genetycznego, a w szczególności mutacji sprawczych i ich częstości występowania u chorych z rozpoznaniem MFM, LGMD i klinicznych fenotypów pokrewnych w populacji polskiej. Kolejnymi celami pracy jest określenie funkcjonalnego znaczenia zidentyfikowanych wariantów genomowych oraz określenie korelacji między genotypem a fenotypem klinicznym, a także wytypowanie prawdopodobnych nowych genów, których mutacje mogą mieć wpływ na wystąpienie i stopień objawów choroby tj. geny sprawcze, współsprawcze i modyfikujące fenotyp. Ostatni cel pracy „Zaproponowanie podstaw nowego podziału MFM i LGMD, opartego na wskazaniu nowych elementów biochemicznych i strukturalnych, mogących leżeć u podłoża tych chorób” zawiera sugestie dotyczącą możliwych zastosowań wyników pracy.

Grupy osób, w których prowadzono badania zostały dobrze scharakteryzowane. Grupa badana chorych z klinicznym rozpoznaniem LGMD i MFM, bez wcześniej wykrytych mutacji sprawczych obejmowała 85 pacjentów z 84 rodzin z klinicznym rozpoznaniem dystrofii mięśniowej, oraz 20 pacjentów z 11 rodzin z kliniczną diagnozą desminopatii (podtyp MFM). W grupie tej znalazło się także 12 przypadków z nieklasyczną manifestacją choroby mięśni, gdzie LGMD było jednym z rozważanych rozpoznań. Dodatkowo zebrano 16 próbek od zdrowych członków rodzin ryzyka LGMD, oraz 8 próbek od zdrowych członków rodzin ryzyka MFM. Jako grupę kontrolną przy ocenie wyników sekwencjonowania eksomowego wykorzystano wykonane uprzednio wyniki sekwencjonowania eksomowego i genomowego 16 pacjentów bez objawów mięśniowych. Należałoby się zastanowić czy 16 osób kontrolnych pochodzących z populacji polskiej jest grupą wystarczającą do weryfikacji patogenności nowo wykrytych mutacji. Choć należy podkreślić, że możliwa patogenność nowo wykrytych wariantów była sprawdzana przez Doktoranta również innymi metodami.

W rozdziale *Metody* szczegółowo i starannie przedstawiono metodykę analiz molekularnych (technikę sekwencjonowania metoda Sanger, genotypowanie z wykorzystaniem starterów znakowanych fluorescencyjnie) i bioinformatycznych. Sekwencjonowanie całego eksomu (WES) wykonano w ramach usługi obcej uzyskując surowe dane do dalszej analizy. Bardzo szczegółowo została przedstawiona wieloetapowa procedura analizowania wyników WES z zastosowaniem wielu programów bioinformatycznych, mająca na celu wyszukiwanie wariantów genów potencjalnie związanych z fenotypem klinicznym konkretnych pacjentów. Opisano zastosowane trzy strategie wyszukiwania wariantów potencjalnie związanych z chorobą (w genach powiązanych z fenotypem mięśniowym, w genach ulegających ekspresji w mięśniach, ale niewiązanych dotychczas z fenotypem mięśniowym oraz rzadkie warianty zmiany liczby kopii). Szczegółowo opisane zostały procedury oceny patogenności zidentyfikowanych mutacji obejmujące m.in. przeprowadzenie analizy znaczenia fenotypowego poszczególnych mutacji za pomocą programów predykcyjnych, sprawdzenie ich obecności w wynikach sekwencjonowania eksomowego pacjentów grupy kontrolnej, a także porównując z danymi w ogólnodostępnych populacyjnych bazach danych oraz w wybranych przypadkach kosegregację mutacji z fenotypem klinicznym w badaniu członków rodzin. Patogenność wybranych mutacji sprawdzano również we współpracy z innymi ośrodkami za pomocą analiz funkcjonalnych *in silico* i analiz immunohistochemicznych *in vitro*, oceniając wpływ mutacji na strukturę produktu białkowego i jego rozmieszczenie w tkance mięśniowej. Autor wykazuje bardzo dobre opanowanie narzędzi bioinformatycznych. Na szczególne uznanie zasługuje duża różnorodność analiz przeprowadzona w trakcie wykonywania badań.

Rozdział *Wyniki* liczy 15 stron. W tej części Doktorant prezentuje w sposób szczegółowy wyniki wielostronnej analizy bioinformatycznej sekwencjonowania eksomowego wykonanego u badanych pacjentów, a także przykładowe wyniki analiz funkcjonalnych *in silico* i *in vitro* wybranych mutacji sprawczych. W bardzo obszernej tabeli 4 przedstawione są m.in. zidentyfikowane mutacje sprawcze w grupie pacjentów z klinicznym rozpoznaniem LGMD. Mam pytania odnośnie prezentacji wyników genotypu pacjentów. Z zapisu nie wynika jednoznacznie czy zidentyfikowane u pacjenta mutacje są zlokalizowane w dwóch różnych allelach tego samego locus (w pozycji *trans*) czy obie mutacje znajdują się w jednym allelu (w pozycji *cis*). Myślę, że należałoby dostosować zapis zidentyfikowanych mutacji do międzynarodowych wytycznych HGVS (np. www.hgvs.org/mutnomen).

W rezultacie przeprowadzonych przez Doktoranta analiz bioinformatycznych w 63,5% przypadków LGMD oraz 83% przypadków MFM zidentyfikowano mutacje, które można uznać za mutacje sprawcze. Mutacje te występowały głównie w genach powiązanych dotychczas z tymi chorobami, ale także w innych genach niewiązanych dotychczas do klasyfikacji tych chorób. U czterech pacjentów za przyczynę choroby uznano mutacje w dwóch różnych genach. Ponadto u wszystkich badanych chorych stwierdzano liczne warianty w genach powiązanych z różnymi objawami chorób mięśniowych, a także rzadkie warianty w obrębie genów niewiązanych wcześniej z chorobami mięśni, ale ulegających ekspresji w mięśniach i których produkty są partnerami produktów białkowych genów już wiązanych z LGMD i MFM. Mutacje te można uznać za mutacje modyfikujące fenotyp. Autor zwraca uwagę na częściowo wspólne podłoże genetyczne przypadków LGMD i MFM.

Na kolejnych stronach w *Dyskusji* Doktorant w sposób rzetelny konfrontuje własne wyniki z rezultatami badań innych autorów, dotyczącymi podłoża genetycznego LGMD i MFM w innych populacjach oraz analizuje znaczenie fenotypowe zidentyfikowanych rzadkich wariantów, występujących zarówno w genach związanych z fenotypem mięśniowym jak i innych genach ulegających ekspresji w mięśniach. Doktorant podkreśla, geny te można pogrupować ze względu na funkcjonalne lub strukturalne powiązania kodowanych przez nie produktów, co może stanowić początek nowej klasyfikacji podtypów klinicznych LGMD. Wydaje się, że część informacji zawartych w *Dyskusji* dotycząca częstości występowania mutacji poszczególnych genów w grupach badanej (np. ryc.5 i 6) mogłaby znaleźć się w rozdziale *Wyniki*.

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorant wyciąga wnioski, że LGMD i MFM lepiej definiować jako zaburzenia oligogenowe lub poligenowe, w których zmienna prezentacja fenotypowa może wynikać z połączonych efektów mutacji w wielu genach. Ponadto wnioskuje, że sekwencjonowanie całego eksomu może być skutecznie stosowane w miopatiach, a w połączeniu z zaawansowaną analizą bioinformatyczną umożliwi pełniejsze przedstawienie podłoża genetycznego tych chorób. Sformułowane przez Doktoranta wnioski odpowiadają ustalonym celom pracy w sposób dość ogólny. Brakuje wniosków odnoszących się do niektórych szczegółowych celów pracy.

Uwagi odnoszące się do redakcji rozprawy:

1. Brak numeracji strony 25;
2. Podwójna strona 26;
3. Na stronie 26 – w legendzie do tabeli 3 brak wyjaśnienia wszystkich skrótów (np. OM i HGMD w nagłówku tabeli);
4. Na stronach 26-32 w tabeli 4 w kolumnie „historia rodzinna”, moje wątpliwości budzi określenie przypadek sporadyczny. Wiele „przypadków sporadycznych”, tj. bez dodatniego wywiadu rodzinnego występuje np. w chorobach o dziedziczeniu autosomalnym recesywnym. Może lepszym określeniem byłoby ujemny wywiad rodzinny. Ponadto dla lepszej czytelności tabela 4 (oraz tabela 7) powinna mieć powtórzony wiersz nagłówkowy na każdej kolejnej stronie.
5. Zauważyłam również niespójności np. w podawanej w różnych miejscach liczebności grupy pacjentów z MFM (na stronie 15 grupa ta liczy 20 pacjentów z 11 rodzin, na stronie 24 - 24 pacjentów z 7 rodzin),

czy liczebności grupy kontrolnej (str. 15 – 16 pacjentów, a na str. 40 - 15 eksomów). Dostrzegłam braki w wykazie skrótów np. dotyczące opisywanych w tekście chorób (np. DM2 czy OPMD).

Powyższe uwagi redakcyjne nie mają wpływu na całokształt i wartość merytoryczną pracy.

W podsumowaniu chcę podkreślić, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska mgr biotechnologii Jakuba Fichny pt. „Identyfikacja i kompleksowa charakterystyka podłoża genetycznego rzadkich miopatii i dystrofii mięśniowych w populacji polskiej” jest pierwszą kompleksową analizą genetyczną pacjentów z polskiej populacji z rzadkimi miopatiami i dystrofiami. Doktorant wykazał się umiejętnością posługiwania się zaawansowanymi analizami bioinformatycznymi, co zasługuje na szczególne uznanie. Osiągnięcie celów, które sobie postawił, wymagało bardzo dużego nakładu pracy i doskonałego przygotowania metodycznego. Zidentyfikowanie obok mutacji sprawczych, mutacji współsprawczych oraz wielu potencjalnych wariantów modyfikujących sugerujących oligogenowe lub poligenowe podłoże LGMD i MFM stanowi istotny naukowo, oryginalny autorski wkład Doktoranta do problematyki badań nad podłożem genetycznym tych chorób w populacji polskiej. Należy podkreślić, że zidentyfikowane mutacje sprawcze odpowiadają za znaczny procent przypadków dystrofii obręczowo-kończynowych i miopatii miofibrilarnych w polskiej populacji, co potwierdza skuteczność diagnostyczną badań z zastosowaniem metod sekwencjonowania nowej generacji w grupach pacjentów z chorobami mięśniowymi.

Przeprowadzone przez Doktoranta badania mają znaczenie poznawcze, ale posiadają również aspekt praktyczny. Niewątpliwie próba ustalenia uwarunkowań genetycznych leżących u podstaw obu chorób umożliwi lepsze poznanie ich patogenez, co może w przyszłości pozwolić na opracowanie przyczynowych sposobów leczenia. Poznanie podłoża genetycznego LGMD i MFM w populacji polskich pacjentów może przyczynić się do opracowania nowych algorytmów diagnostycznych tych chorób w naszej populacji oraz do wykorzystania wyników diagnostyki w poradnictwie genetycznym rodzin ryzyka.

Na koniec należy podkreślić, że wyniki umieszczone w rozprawie zostały częściowo opublikowane w dwóch artykułach w recenzowanych anglojęzycznych czasopismach naukowych o wysokim IF, co potwierdza ich wartość merytoryczną i wysoki poziom naukowy pracy doktorskiej mgr Jakuba Fichny.

Uważam, że przedstawiona do recenzji rozprawa na stopień doktora nauk pt. „Identyfikacja i kompleksowa charakterystyka podłoża genetycznego rzadkich miopatii i dystrofii mięśniowych w populacji polskiej” jest oryginalnym dorobkiem Doktoranta i spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Z przyjemnością zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława J. Mossakowskiego PAN w Warszawie o dopuszczenie magistra biotechnologii Jakuba Fichny do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. n. med. Małgorzata Bednarska-Makaruk
Zakład Genetyki
Instytut Psychiatrii i Neurologii
Warszawa, ul. Sobieskiego 9

Warszawa, 07.11.2017