

Recenzja pracy doktorskiej pod tytułem:

Opracowanie algorytmu poszukiwania predyspozycji genetycznych w genie *BRCA2* u chorych na raka piersi lub jajnika

autorstwa

Anety Bałabas

Celem przedstawionej do recenzji Pracy było ustalenie algorytmu poszukiwania predyspozycji genetycznych w obrębie genu *BRCA2* u chorych na raka piersi lub jajnika. Cel był inspirowany dobrze udokumentowanym występowaniem w naszej populacji stosunkowo ograniczonego profilu patogennych mutacji w genie *BRCA1*, co pozwoliło na opracowanie bardzo ekonomicznych metod ich wykrywania.

Cel pracy należy uznać za bardzo dobrze uzasadniony naukowo i ważny z praktycznego punktu widzenia

Zastosowana strategia badawcza polegała na poszukiwaniu mutacji *BRCA2* wśród trzech grup kobiet chorych na raka piersi i/lub jajnika z użyciem trzech różnych metod analitycznych: wysokosprawnej denaturacyjnej chromatografii cieczowej (dHPLC), genotypowania metodą dyskryminacji alleli oraz sekwencjonowania następnej generacji na platformie Proton Ion. Dodatkowo stosowano sekwencjonowanie Sangera jako metodę walidacji.

W pierwszym etapie badano 105 kobiet, u których we wcześniejszych badaniach (nie będących częścią Rozprawy) nie wykryto mutacji w genie *BRCA1*. Wyniki pierwszego etapu ujawniły 11 patogennych mutacji u 13 chorych. Występowanie tych mutacji było następnie oceniane wśród 1711 chorych oraz w grupie kontrolnej 2291 osób zdrowych. Wykryto 5 mutacji określonych jako patogene u 13 niespokrewnionych chorych. Najczęstszą mutacją (5467insT) wystąpiła u 5 chorych, kolejna (6174delT) u 4, a następna (8138del5) u 2 osób. W grupie kontrolnej nie znaleziono żadnej z badanych mutacji. W trzeciej fazie projektu (NGS) przebadano 512 chorych kobiet, u których w II fazie badań nie znaleziono mutacji

patogennych. W wyniku analizy genu *BRCA2* metodą NGS patogene mutacje stwierdzono u 24 kobiet, co stanowi 4,7%. Ogólna konkluzja pracy to brak mutacji założeńskich w genie *BRCA2* w populacji Polski, co utrudnia stosowanie w diagnostyce testów celowanych na konkretne mutacje.

Przedstawiona do recenzji Rozprawa liczy 87 stron. Praca ma typowy układ, zawiera spis treści, wykaz skrótów, streszczenie, wstęp, sformułowany cel pracy, opis materiałów, metod, uzyskanych wyników, podsumowanie, wnioski, spis piśmiennictwa, źródła finansowania pracy. Dodatkowo Praca zawiera załącznik, w którego skład wchodzi kopie 3 publikacji zawierających wyniki badań prezentowanych w rozprawie (Familial Cancer, 2010, 9:267–274, Familial Cancer 2012 11:623–628, BMC Medical Genomics (2015, 8:19). Kandydatka jest, odpowiednio, pierwszym, czwartym i drugim autorem tych prac.

Opublikowanie wyników w międzynarodowym piśmiennictwie w oczywisty sposób wskazuje na dużą wartość Rozprawy.

Wstęp rozpoczyna dobre wprowadzenie do zagadnień epidemiologii raka piersi i jajnika na świecie i w Polsce oraz czynników wpływających na ryzyko zachorowania. Następnie omówiona jest budowa i funkcja genu *BRCA2* oraz spektrum mutacji *BRCA2* z naciskiem na mutacje założeńskie w różnych populacjach. Istotną częścią wstępu stanowi omówienie korzyści i zagrożeń wynikających z przeprowadzenia badań genetycznych u chorych na raka piersi i jajnika.

Wstęp stanowi znakomite wprowadzenie do tematu oraz, co ważne, przedstawia przekonujące uzasadnienie celu Pracy.

Wstęp jest poprzedzony „Streszczeniem”, które jest stosunkowo obszerne bo liczy prawie 2 strony. Uważam, że streszczenie powinno być krótsze i jednocześnie bardziej zwarte – zamiast szerokiego opisywania aspektów epidemiologicznych chorób nowotworowych należało bardziej skupić się na wynikach Pracy. W obecnej wersji brak jest np. wyszczególnienia liczby mutacji znalezionych w poszczególnych grupach, a są podawane szczegółowe liczby nowych zachorowań na raka piersi i jajnika na świecie.

Sekcja „Cel pracy”, poza właściwym opisem celu badań zawiera także jego uzasadnienie, co wydaje się niepotrzebne. Faktycznie w tej części wystarczyłoby tylko

ostatnie zdanie: „Celem mojej pracy było ustalenie praktycznego algorytmu poszukiwania predyspozycji genetycznych w obrębie genu BRCA2 u chorych na raka piersi lub jajnika.”

Sekcja „Metody” szczegółowo opisuje procedury izolacji DNA z leukocytów krwi obwodowej oraz plam krwi, pomiar stężenia DNA, amplifikacje, technikę dHPLC, sekwencjonowanie metodą Sanger, genotypowanie metodą dyskryminacji alleli oraz technikę NGS w rozbiciu na przygotowanie bibliotek, wykonanie emulsyjnego PCR, załadowanie chipa i sekwencjonowanie.

Szeroki zakres stosowanych metod stanowi mocną stronę pracy i dowodzi wysokiej sprawności technicznej Kandydatki.

W części „Wyniki” Autorka przedstawia uzyskane rezultaty w rozbiciu na I, II etap projektu, ich podsumowanie oraz wyniki III etapu. Dla każdej mutacji znalezionej metodą dHPLC Autorka prezentuje odpowiedni wzorzec rozdziału, dla badań metodą dyskryminacji alleli także pokazane są przykładowe wyniki. Brakuje natomiast równie szczegółowej prezentacji wyników NGS. W szczególności w opisach eksperymentów z użyciem NGS zawsze podaje się parametry pokrycia czego nie mogłem znaleźć w Pracy. Czy wszystkie amplikony miały min. 20-krotne pokrycie?

W części „Wyniki” brak jest także opisu zmian niejednoznacznych lub polimorficznych. Omówienie wyników tego rodzaju zmian znajduje się dopiero w Dyskusji.

W „Dyskusji” Autorka omawia uzyskane wyniki w kontekście istniejącego piśmiennictwa skupiając się na aspektach ekonomicznych (cena badań różnego typu). Dyskusję kończą „Wytyczne dla poszukiwania predyspozycji genetycznych rodzinnego raka piersi i jajnika w genie *BRCA2*”. Całą pracę kończy lista cytowanego piśmiennictwa, która liczy 123 pozycje. Piśmiennictwo jest dobrze dobrane i aktualne.

Pracę kończy „Podsumowanie” i „Wniosek”. Na początku „Podsumowania” Autorka pisze o NGS „...z pomocą tej metody można wykrywać zmiany genetyczne zarówno pojedynczych nukleotydów, insercje, delecje, jak również zmiany liczby kopii i duże rearanżacje.” Stwierdzenie, choć ogólnie prawdziwe, jest nie końca uzasadnione w tak eksponowanym miejscu ponieważ w Pracy nie znaleziono żadnej zmiany tego typu. Dodatkowo nie jest jasne czy takie zmiany były w ogóle poszukiwane i na ile czułość

wykrywania wariantów strukturalnych met. NGS zastosowaną do badania amplikonów jest porównywalna z czułością w sekwencjonowaniu całogenomowym.

Nie do końca zgadzam się z też ze sformułowaniem ostatecznego wniosku pracy, który brzmi: „Brak mutacji założycielskich w genie *BRCA2* sprawia, że w poszukiwaniu jego patogennych mutacji w wybranych grupach kobiet chorych na raka piersi i jajnika obowiązującą metodą powinno stać się masowe sekwencjonowanie amplikonów tego genu.”

Autorka przekonująco wykazała, że brak w naszej populacji mutacji założycielskich *BRCA2* utrudnia stosowanie analizy celowanej natomiast nie zajmowała się zupełnie porównaniem metod NGS nie opartych na badaniu amplikonów ale wykorzystujących inne technologie wzbogacania na przykład oparte na hybrydyzacji. Wzbogacanie oparte na hybrydyzacji ma przewagę nad wzbogacaniem opartym na PCR – metody oparte na PCR, bardziej niż metody hybrydyzacyjne, są wrażliwe na artefakty związane z mutacjami punktowymi (możliwość zmiany miejsc wiążących startery). Uważam, że wniosek Pracy powinien jedynie zawierać stwierdzenie o przewadze metod NGS nad analizą celowaną oraz analizą dHPLC.

Ogólna uwaga dotyczy braku omówienia we wstępie, wynikach czy dyskusji zagadnienia patogenności mutacji *BRCA2*. Wydaje się, że Autorka milcząco zakłada, że mutacje o przewidywanym efekcie skracające białko są patogenne. Nie jest to oczywiste ponieważ istnieją przykłady genów, w których mutacje skracające są z **reguły niepatogenne** oraz genów, w których **nie wszystkie** mutacje skracające są patogenne. Z drugiej strony oczywisty jest też fakt, że pewne mutacje *missense* mogą być równie patogenne jak mutacje skracające. Zagadnienie klasyfikacji wariantów genetycznych znajdujących przy szeroko zakrojonych badaniach genetycznych takich jak badania prowadzone przez Autorkę jest zagadnieniem ważnym i choć nie było ono celem pracy, powinno zostać przynajmniej krótko poruszone.

Praca jest napisana bardzo dobrym, jasnym i precyzyjnym językiem. Znalazłem tylko dwa przypadki do korekty:

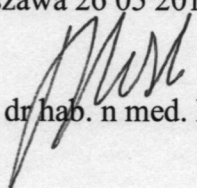
- 1) Skrót NGS jest definiowany jako sekwencjonowanie nowej generacji w „Wykazie stosowanych skrótów” lub sekwencjonowaniem wielkoskalowym w „Streszczeniu”. Brakuje nazwy ‘sekwencjonowanie następnej generacji’, która stanowi bezpośrednie tłumaczenie angielskiego pierwowzoru: „next - generation sequencing”.

- 2) W tabeli 13 kolumna „Wiek rozpoznania” zawiera też informację o samym rozpoznaniu, bardziej stosowna byłaby nazwa np. „Rodzaj i wiek rozpoznania”

Pomimo opisanych powyżej uwag uważam, że przedstawiona praca pt: „Opracowanie algorytmu poszukiwania predyspozycji genetycznych w genie *BRCA2* u chorych na raka piersi lub jajnika” autorstwa Anety Bałabas spełnia wymagania stawiane rozprawie na stopień doktora nauk medycznych i w związku z tym wnioskuję o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na szeroki zakres przeprowadzonych badań oraz duże praktyczne znaczenie uzyskanych wyników wnioskuję o wyróżnienie Pracy.

Warszawa 26 05 2016


Prof. dr hab. n med. Rafał Płoski