

dr hab. Joanna Wesoły, prof. UAM
Pracownia Technologii Wysokoprzepustowych
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
Ul. Umultowska 89
61-614 Poznań

Poznań, 2016.02.17

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Marty Kaczmarek-Ryś zatytułowanej: „Analiza mutacji i polimorfizmów w genie *RET* u chorych z dziedzicznym i sporadycznym rakiem rdzeniastym tarczycy”.

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska została wykonana w ramach realizacji projektu badawczego finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, zatytułowanego „Analiza asocjacji polimorfizmów wybranych genów z ryzykiem wystąpienia nowotworu tarczycy, jego klinicznym przebiegiem i odpowiedzią na leczenie”, którego mgr Kaczmarek-Ryś była kierownikiem. Zarówno projekt jak i praca doktorska zostały zrealizowane w ramach współpracy trzech jednostek naukowych: Instytutu Genetyki Człowieka PAN, Katedry Biochemii i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego oraz Katedry i Kliniki Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu w Poznaniu, a pracą kierowali: prof. dr hab. Ryszard Słomski oraz dr hab. Katarzyna Ziemnicka, prof UM.

Głównym celem pracy była analiza mutacji germinalnych w genie *RET* i ich rozkład w populacji polskiej. Analizy wykonano u 267 osób, zarówno pacjentów, jak i członków rodzin z rzadkim nowotworem neuroendokrelnym tarczycy, wywodzącym się z komórek okołopęcherzykowych C - rakiem rdzeniastym, a następnie skorelowano obecność mutacji z obrazem klinicznym pacjentów. Badania te umożliwiły identyfikację mutacji i polimorfizmów specyficznych dla pacjentów z populacji polskiej, wykonanie analizy nosicielstwa w rodzinach pacjentów i opracowanie testów pozwalających na wykrycie najczęstszych mutacji w genie *RET*. Doświadczenia wykonane zostały z wykorzystaniem metod pyrosekwencjonowania oraz wysokorozdzielczej analizy topnienia fragmentów DNA (HRMA).

W wynikach pracy Kandydatka opisuje, że najczęstszą mutacją obserwowaną u pacjentów z regionu Wielkopolski z dziedziczną formą nowotworu jest mutacja w kodonie 634 eksonu 11 i występuje ona u 70,6% pacjentów z RTT. U osób z pozornie sporadycznym RRT mutacje w eksonach 13 i 14 były identyfikowane najczęściej, z mutacją Y719F jako główną zmianą w tych eksonach. Natomiast mutacje w eksonie 10, częste w innych populacjach, były w populacji polskiej rzadkie i obserwowano je tylko u 2% badanych pacjentów. Badania te podkreślają, jak ważne jest przeprowadzanie testów genetycznych wśród członków rodzin pacjentów z RRT, gdyż analiza genu *RET* umożliwiła identyfikację osób z mutacjami w tym genie przed wystąpieniem objawów choroby (15 osób) i podjęcie działań profilaktycznych oraz wczesne wykrycie choroby (6 osób).

Jeśli chodzi o polimorfizmy typu SNP, w genie *RET* oznaczono siedem najczęściej raportowanych w literaturze wariantów: w eksonach: 2 (rs1800858), 7 (rs1800860), 11

(rs1799939), 13 (rs1800861), 14 (rs1800862) i 15 (rs1800863) oraz intronie 1 tego genu (rs2435357). Jedynie częstość jednego wariantu – SNP znajdującego się w eksonie 7 (rs1800860) odbiegała od częstości sugerowanej w bazie danych 1000 Genomes Project, a była podobna do częstości w populacji czeskiej. Analiza haplotypów sugeruje, iż w sporadycznym RRT występują dwie specyficzne kombinacje alleli, które są nieobecne w locus pacjentów z rodzinną formą nowotworu, natomiast trzy haplotypy charakteryzują grupę z rodzinną formą RRT, należy jednak pamiętać, że wyniki te nie uzyskały istotności statystycznej, co z resztą Autorka sama zaznacza w opisie wyników.

Muszę przyznać, że po raz pierwszy przy ocenie pracy doktorskiej nie mam komentarzy dotyczącej aspektów edytorskich. Mogłabym się tylko przyczepić do użycia słowa *allel* – a właściwie jego odmiany w paru zdaniach w tekście, ale to jest już szukanie igły w stogu siana. Praca została przygotowana z ogromną uwagą jeśli chodzi o grafikę i układ tekstu. Załączone ryciny i tabele przedstawione są przejrzysto, z dokładnymi opisami, a ich układ i forma są bardzo dobrze dobrane i ułatwiają czytającemu zrozumienie tekstu. Wprowadzenie literaturowe jest szczegółowe, napisane dostępnym językiem i obejmuje wszystkie informacje potrzebne do interpretacji danych w dalszych rozdziałach doktoratu. Z przyjemnością czytałam także Dyskusję, która jest zarówno obszerna jak i rzeczowa, co ukazuje, iż Autorka bardzo dobrze orientuje się w dostępnej literaturze i stanowi świadectwo dojrzałości naukowej.

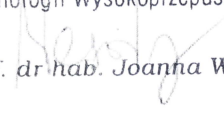
Biorąc pod uwagę założone cele, po przeczytaniu pracy i przeanalizowaniu wykonanych doświadczeń nasunęły mi się uwagi oraz pytania i prosiłabym, aby Kandydatka odniosła się do nich w czasie obrony pracy doktorskiej.

1. W tekście doktoratu Kandydatka wspomina o łączeniu kilku produktów PCR i jednoczesnej analizie kilku sekwencji oraz problemach związanych z zaprojektowaniem takiego testu z użyciem metody HRMA dla eksonu 11 genu *RET* - czy biorąc pod uwagę rozwój technologii sekwencjonowania w ostatnich latach Kandydatka zdecydowałaby się na użycie takich samych technik w dniu dzisiejszym?
2. W opisie wyników Autorka nadmienia, iż tylko u pacjentki 8408 wraz z mutacją Y791F współistniała mutacja C634R w eksonie 11 genu *RET*. Czy często obserwuje się więcej niż jedną mutację w tym genie u pacjentów z RRT (na podstawie doniesień literaturowych)? Rozumiem, że w badanej grupie był to jedyny taki przypadek?
3. W opisie analizy haplotypów zamieszczona jest uwaga „nie wykonano analizy w grupie populacyjnej, ponieważ korzystano z różnych próbek”. Co Autorka ma na myśli?
4. Chciałabym się także zapytać, co zdaniem Kandydatki jest powodem rozbieżności w częstości występowania mutacji w genie *RET* w różnych ośrodkach w Polsce. Ilu pacjentów obejmowały badania w Warszawie i Gliwicach?
5. W dyskusji nadmieniono, iż analizy statystyczne korelacji mutacji i obrazem klinicznym RRT przeprowadzone zostały na stosunkowo nielicznej grupie chorych, co

w konsekwencji wiąże się z niewielką liczbą parametrów istotnych statystycznie uzyskanych w ramach tych analiz. Czy istnieją dane literaturowe sugerujące korelacje mutacji w genie *RET* z danymi klinicznymi? W jaki sposób sugerowałaby Pani przeprowadzenie takich analiz?

6. Czy przeprowadzono badania mające na celu analizę interakcji polimorfizmów/mutacji w różnych genach w RRT?

Po przeczytaniu przedłożonej pracy doktorskiej uznaję, iż przedłożona praca spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim i zwracam się zatem do Rady Naukowej Instytutu Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu o dopuszczenie mgr inż. Marty Kaczmarek-Rys do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Joanna Wesoly
Kierownik Pracowni
Technologii Wysokoprzepustowych

prof. dr hab. Joanna Wesoly