

**Ocena rozprawy doktorskiej  
Pani mgr Małgorzaty Kurkowiak**

**Tytuł rozprawy:**

***Analiza nowych genów zaangażowanych w patogenezę pierwotnej dyskinezy  
rzęsek.***

**Promotor: Prof. dr hab. med. Michał Witt  
Ko-promotor: Prof. dr med. Heymut Omran**

Pierwotna dyskineza rzęsek (*Primary Ciliary Dyskinesia-PCD*) to choroba dziedziczna zazwyczaj o autosomalnym recesywnym toku dziedziczenia. Należy do ciliopatii, czyli chorób, których przyczyną jest dysfunkcja rzęsek i wici. Jest stosunkowo rzadko występującą chorobą przede wszystkim układu oddechowego a częstość jej występowania ocenia się na 1:16 000 żywo urodzonych, choć w opinii wielu badaczy częstość ta jest zdecydowanie zaniżona. W znacznej części przypadków przewlekłym zmianom obturacyjnym układu oddechowego towarzyszą zaburzenia lateralizacji narządów wewnętrznych i niepłodność będąca skutkiem zaburzonej ruchomości rzęsek i wici plemników. Charakterystycznej dla tej choroby zmienności objawów klinicznych towarzyszy ogromna heterogenność genetyczna związana z dużą liczbą białek zaangażowanych w wytworzenie prawidłowej struktury rzęsek. Mutacje w ponad 20 poznanych do chwili obecnej „genach PCD” wyjaśniają molekularne podłoże choroby jedynie w nieco ponad połowie przypadków. Znamienna jest także częstość mutacji w poszczególnych genach w różnych populacjach. Jak najwcześniejsze ustalenie rozpoznania choroby u pacjenta ma istotne znaczenie dla rokowania oraz ustalenia właściwego postępowania terapeutycznego, mającego na celu jak najdłuższe utrzymanie prawidłowej funkcji płuc.

Badania mające na celu wyjaśnienie podłoża molekularnego choroby, analiza mutacji w poznanych już genach jak też poszukiwanie i identyfikacja nowych genów determinujących chorobę mają więc nie tylko wartość poznawczą. Z klinicznego punktu widzenia stwarzają szansę jak najwcześniejszego ustalenia rozpoznania choroby u pacjenta.. Należy mieć nadzieję, graniczącą z pewnością, że zastosowanie nowych technik badawczych, a przede wszystkim sekwencjonowania następnej generacji (NGS) zapewne szybko uzupełni naszą wiedzę w tym zakresie.

W kontekście powyższych stwierdzeń wybór tematu pracy doktorskiej Pani mgr Małgorzaty Kurkowiak należy uznać za bardzo interesujący i ważny, zarówno z poznawczego, jak i z praktycznego punktu widzenia. Jest dowodem możliwości wykorzystania nowoczesnego

warsztatu badawczego do podjęcia próby analizy mutacji nowo poznanych genów determinujących pierwotną dyskinezę rzęsek w kontekście ich roli w regulacji białek ciliomu (będącego kompleksem kilkuset białek) oraz ich wpływu na funkcjonowanie rzęsek. Okazuje się, że mutacja każdego z genów kodujących jeden z komponentów ultrastruktury rzęsek może być przyczyną PCD a dwie trzecie pacjentów jest nosicielami mutacji genowej skutkującej defektem w obrębie zewnętrznych ramion dyneinowych (*ODA – Outer Dynein Arm*). Złożoność etiopatogenezy choroby określa między innymi fakt, że mutacje w różnych genach mogą skutkować podobnym defektem strukturalnym.

Sformułowany przez Doktorantkę cel pracy zawierający zarówno próbę poznania nowych genów jak też analizę funkcjonalną ich mutacji należy uznać za ambitny i wpisujący się we współczesny nurt badań nad podłożem molekularnym chorób dziedzicznych. Warunkiem realizacji tak sformułowanego celu był dostęp do odpowiednio licznego materiału badawczego a w tym przypadku próbek DNA i nabłonka oddechowego pacjentów z PCD. Spełnienie tego warunku zapewniła możliwość realizacji badań w Zakładzie Genetyki Molekularnej i Klinicznej Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu oraz w Laboratorium Kliniki i Polikliniki Chorób Dzieci i Młodzieży w Münster, w których przechowywane są w/w próbki pacjentów z rozpoznaniem klinicznym pierwotnej dyskinezy rzęsek. Należy w tym miejscu podkreślić to, że Zakład kierowany przez Pana Prof. Michała Witta, zajmujący się badaniami nad molekularnym podłożem chorób dziedzicznych układu oddechowego od lat prowadzi też badania nad molekularnym podłożem ciliopatii, mając w tej dziedzinie znaczące i udokumentowane publikacjami dokonania naukowe. Oba ośrodki, w których doktorantka prowadziła badania zapewniły, poza materiałem badawczym, także nowoczesny warsztat laboratoryjny, który umożliwił realizację założonych celów.

Przedstawiona mi do ceny praca ma typowy dla rozpraw doktorskich układ redakcyjny. Napisana jest w języku angielskim natomiast w języku polskim przygotowane jest dość obszerne streszczenie. Praca zawiera 131 stron maszynopisu, składa się z 8 rozdziałów i zawiera 8 tabel, 18 rycin a także 8 dodatkowych tabel, zamieszczonych na końcu rozprawy, zawierających spis stosowanych odczynników, sprzętu, wykorzystywanych starterów oraz przeciwciał a także inicjały badanych pacjentów wraz z wybranymi, w kontekście zidentyfikowanych mutacji, danymi klinicznymi. Piśmiennictwo zawiera zestaw około 195 nie numerowanych tytułów publikacji ułożonych alfabetycznie. Rozprawę poprzedza szereg informacji, m.in. dotyczących źródeł współfinansowania badań: ze środków Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej i Unii Europejskiej. Niektóre wyniki badań uzyskane w trakcie realizacji projektu doktorskiego zostały opublikowane w 2 artykułach zamieszczonych w *American Journal of Human Genetics* (2013, 2014) oraz w *Cilia* (2012), w których doktorantka jest współautorem. Autorka podaje także tytuły 7 prezentacji posterowych dotyczących tematyki rozprawy doktorskiej (w których była



pierwszym autorem) prezentowanych na zjazdach i konferencjach naukowych w kraju i zagranicą.

We wprowadzeniu Autorka omawia wyczerpująco istotę budowy i zróżnicowania zarówno struktury jak i funkcji organelli komórkowych, jakimi są rzęski, w organizmach jednokomórkowych jak i u naczelnych oraz człowieka. Szeroki przegląd wiedzy o budowie i funkcji rzęsek dokumentuje wynikami badań na różnych organizmach modelowych, podkreślając istotę genetycznego uwarunkowania kompleksu ponad 1000 białek tworzących strukturę rzęsek. Analiza struktury i budowy rzęsek, uwzględniająca najnowsze wyniki badań i obserwacji uzupełniona bardzo dobrymi rycinami sprawia, że ta część doktoratu staje się dobrym kompendium współczesnej wiedzy dotyczącej tak morfologii jak i funkcji rzęsek. Także podrozdziały poświęcone patogenecie i symptomatologii klinicznej pierwotnej dyskinezy rzęsek opracowane są dostatecznie wyczerpująco. Autorka słusznie wiele uwagi poświęca metodom stosowanym w diagnostyce klinicznej tej zróżnicowanej fenotypowo choroby. Nie wszystkie one bowiem mają jednakową czułość i specyficzność w diagnostyce różnicowej. W tym kontekście szczególnie ważne stają się badania molekularne genów determinujących funkcje rzęsek. Genetyczna heterogenność PCD zmusza do poszukiwania mutacji w znanych już genach a także poszukiwanie nowych mutacji o innej lokalizacji genowej. Znane dotychczas mutacje 29 genów umożliwiają wczesne potwierdzenie choroby jedynie w około 50-60% przypadków. Heterogenność efektów fenotypowych mutacji tych genów odnośnie do struktury rzęsek u chorych z PCD Autorka omawia szczegółowo dokumentując wyniki tych rozważań w tabeli 7.

Podsumowując tą część doktoratu można stwierdzić, że stanowi ona nie tylko dobre wprowadzenie czytelnika w istotę, tło genetyczne jak i problematykę kliniczną pierwotnej dyskinezy rzęsek lecz także spełnia zamierzenie Autorki mające na celu udokumentowanie zasadności podjęcia tej tematyki badawczej. Także założenia pracy jak i sformułowany cel badawczy są logicznie i dobrze uzasadnione. Ogólnym celem projektu doktorskiego było więc podjęcie badań nad genetycznym uwarunkowaniem pierwotnej dyskinezy rzęsek zaś celem szczegółowym – poszukiwanie nowych genów determinujących chorobę oraz analiza funkcjonalna zidentyfikowanych w nich mutacji. Materiałem do badań były próbki DNA i nabłonka oddechowego pacjentów z PCD zgromadzone i przechowywane w Laboratorium Kliniki i Polikliniki Chorób Dzieci i Młodzieży w Münster (1587 rodzin) oraz Instytucie Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu (172 rodzin), w których dotychczasowe badania nie wykazały obecności mutacji warunkującej PCD. Badania przeprowadzono po uprzednim uzyskaniu świadomej zgody badanych pacjentów oraz akceptacji badań przez właściwe Komisje Bioetyczne w Niemczech i Polsce.

W rozdziale *Metody* Autorka omawia szczegółowo i w sposób bardzo kompetentny poszczególne etapy analizy molekularnej oraz stosowane techniki badawcze. Dzięki

bioinformatycznej analizie *in silico* obejmującej analizę sprzężeń i mapowanie homozygotyczności. Autorka mogła wytypować regiony, w obrębie których można było się spodziewać mutacji w genach kandydatów PCD. Inne ze stosowanych w pracy metod badawczych to m.in. wysokorozdzielcza analiza krzywej topnienia produktu PCR (jako metoda przesiewowa w poszukiwaniu mutacji w genie *ZMYND10*), analiza danych z transmisyjnego mikroskopu elektronowego umożliwiającą ocenę przekroju rzęski z preparatów tkanki nabłonka oddechowego pacjentów a także barwienie immunofluorescencyjne preparatów z użyciem specyficznych przeciwciał umożliwiające lokalizację badanego białka w obrębie komórki rzęskowej. Badania, jak wspomniałem, wykonywane były zarówno w ZGMiK Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu jak też w laboratorium prof. Heymuta Omrana w Münster.

W wyniku podjętych w ramach projektu badań mgr Małgorzata Kurkowiak przeprowadziła analizę 24 genów kandydatów identyfikując łącznie 10 mutacji w trzech nowych genach zaangażowanych w patogenezę PCD a mianowicie: *LRRC6*, *ZMYND10* oraz *CCDC151*. W genie *LRRC6* zidentyfikowała siedem nowych mutacji, spośród których istnienie dwóch, u pacjentów z PCD, potwierdzili także inni badacze. Najczęściej stwierdzaną mutacją była delecja dwóch nukleotydów w eksonie 5 genu prowadząca do przedwczesnej terminacji translacji. Natomiast w genie *ZMYND10* liczba znanych dotąd mutacji zwiększyła się do 15 dzięki zidentyfikowaniu przez doktorantkę kolejnej nowej mutacji polegającej na delecji eksonów 7-12. Ponadto zidentyfikowała także (u dwóch niespokrewnionych ze sobą pacjentów) nową mutację (c.367delC) występującą u chorych z PCD w populacji słowiańskiej. Natomiast w genie *CCDC151* zidentyfikowała u jednego pacjenta mutację STOP (c925G>T, p.E 308\*).

Użycie technik barwienia immunofluorescencyjnego oraz analiza przekroju poprzecznego rzęski w transmisyjnym mikroskopie elektronowym wykazały brak zewnętrznych i wewnętrznych ramion dyneinowych u wszystkich pacjentów nosicieli mutacji tych 3 genów. Porównując uzyskane dane z wynikami badań na organizmach modelowych doktorantka wnioskuje, że białka kodowane przez te geny pełnią istotną rolę w procesie składania ramion dyneinowych. U wszystkich pacjentów nosicieli mutacji w tych genach obserwowano defekt zarówno zewnętrznych jak i wewnętrznych ramion dyneinowych. Jest on zresztą najczęściej występującą wadą ultrastruktury rzęski u chorych z pierwotną dyskinezą rzęsek. Każdy z nowo zidentyfikowanych genów koduje białko cytoplazmatyczne, nieobecne w aksonemie. Jako białka cytoplazmatyczne, a więc fizycznie bardziej dostępne, mogą w opinii Autorki stanowić potencjalny cel dla opracowywania nowych terapii w tej chorobie.

Rozdział poświęcony dyskusji zawiera obszernie i bardzo szczegółowe omówienie uzyskanych wyników w kontekście współczesnych możliwości wykorzystania analiz proteomicznych i bioinformatycznych w poszukiwaniu nowych mutacji determinujących zaburzenie struktury i funkcji rzęsek. Analizując zidentyfikowane mutacje w genach *LRRC6*,



*CCDC151* i *ZMYND10* doktorantka prezentuje szeroką wiedzę dotyczącą ich skutków fenotypowych u innych organizmów a także charakterystykę i częstości występowania mutacji genowych zidentyfikowanych przez innych autorów. Rozważania Autorki zarówno dotyczące molekularnego podłoża dysfunkcji rzęsek jak też złożonego procesu tworzenia i budowy ramion dyneinowych dokumentują dogłębną wiedzę w zakresie podjętej problematyki badawczej jak też szeroką znajomość literatury przedmiotu oraz umiejętność adekwatnego wykorzystania w swych rozważaniach nad etiopatogenezą choroby wyników badań uzyskanych i opublikowanych przez innych badaczy.

Na podstawie uzyskanych wyników mgr Małgorzata Kurkowiak sformułowała cztery wnioski zawarte w VII rozdziale rozprawy.

Przedstawioną mi do oceny rozprawę oceniam bardzo dobrze. Jest ona dowodem ogromnej pracy badawczej, dobrze przemyślanej i zorganizowanej zarówno w wymiarze koncepcji jak i realizacji badań. Pani mgr Małgorzata Kurkowiak udokumentowała dużą wiedzę teoretyczną, dotyczącą aspektów biologicznych i klinicznych pierwotnej dyskinezy rzęsek, jak też profesjonalizm w zakresie stosowania nowoczesnego spektrum metod i technik biologii molekularnej w badaniach nad patologią molekularną dysfunkcji rzęsek. Bogate piśmiennictwo, cytowane w rozprawie właściwie, zawiera też publikacje autorów polskich. Autorka w pracy zastosowała typowy, kliniczno-kontrolny model analizy stosowanej często w badaniach genetycznych, które mają na celu wykazanie oraz charakterystykę zmian molekularnych determinujących określone efekty fenotypowe. Autorka założyła cel pracy zrealizowała, dokumentując zarówno znajomość metod analizy bioinformatycznej, molekularnej i immunohistochemicznej a także stosowny krytycyzm w interpretacji uzyskanych wyników. Praca ma niezaprzeczalną wartość poznawczą, wpisując się na trwałe w literaturę przedmiotu. Uzyskane wyniki niewątpliwie wzbogacają wiedzę potrzebną do lepszego zrozumienia procesu składania ramion dyneinowych w rzęskach. Natomiast ich praktyczna wartość polega na tym, że zidentyfikowane mutacje poszerzają panel molekularnych testów diagnostycznych oferowany pacjentom z podejrzeniem PCD umożliwiając większej liczbie chorych wczesne ustalenie rozpoznania choroby i podjęcie właściwego leczenia już we wczesnym dzieciństwie. Godne podkreślenia jest to, że Pani mgr Małgorzata Kurkowiak jest współautorką trzech publikacji z zakresu tematyki badawczej rozprawy doktorskiej, w czasopiśmie o wysokim standardzie recenzenckim, z których dwie zamieszczone zostały w czasopiśmie z listy filadelfijskiej.

Jak już wspominałem wcześniej, oceniana rozprawa doktorska świadczy dobrze zarówno o warsztacie laboratoryjnym doktorantki jak i Jej potencjale naukowym. Nie sposób jednak nie podkreślić znaczenia warunków, jakie zostały stworzone poprzez możliwość korzystania z zaplecza badawczego obu ośrodków naukowych w Poznaniu i Münster, jak też wykorzystania materiału badawczego reprezentującego unikalną pod względem liczby kohortę

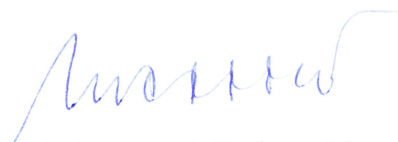
rodzin pacjentów z PCD. Jest oczywiste, że w tego typu projektach badawczych tylko dostatecznie duża liczba przypadków może zapewnić sukces badawczy w postaci wiarygodnych wyników umożliwiających ich analizę i wnioskowanie.

Nie mam w zasadzie istotnych uwag i zastrzeżeń. Praca jest modelowa i zawiera wszystkie elementy projektu badawczego w zakresie genetyki medycznej. Sformułowane wnioski są zasadne i adekwatne do uzyskanych przez doktorantkę wyników. Na szczególne podkreślenie zasługuje staranna szata edytorska pracy a przede wszystkim bardzo dobra dokumentacja graficzna. Nie podzielam jednak sceptycznej opinii Doktorantki, co do roli sekwencjonowania następnej generacji w identyfikacji nowych genów i mutacji genowych determinujących chorobę. Koszty badania z wykorzystaniem tej metody są coraz niższe i nie jest ona „zarezerwowana” dla badań podstawowych. Niewątpliwie „wąskim gardłem” metody są problemy w interpretacji uzyskiwanych wyników a świadomość tego problemu u bioinformatyka jest całkowicie zrozumiała. Nie jest też wykluczone, że zarówno całogenomowe jak też eksomowe sekwencjonowanie ujawnić może nowe problemy istotne dla heterogenności genetycznej choroby będące np. wynikiem zmienności sekwencji powtórzonych? Wiele uwagi doktorantka w swych rozważaniach poświęciła heterogenności genetycznej pierwotnej dyskinezy rzęsek. Choroba może być bowiem modelowym przykładem występowania heterogenności dotyczącej locus. Czy także allelicznej? PCD dziedziczy się przede wszystkim jako cecha autosomalna recesywna (a nie dominująca) i jak wiadomo defekt molekularny determinujący objawy kliniczne zlokalizowany jest w różnych regionach genomu. W pracy nie znalazłem informacji dotyczącej chromosomalnej lokalizacji nowych genów, w których Autorka zidentyfikowała mutacje. Natomiast z klinicznego punktu widzenia byłbym wdzięczny za informację, u ilu pacjentów nosicieli zidentyfikowanych mutacji stwierdzano odwrócenie trzew, jako częsty objaw towarzyszący pierwotnej dyskinezie rzęsek.

Reasumując, przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Małgorzaty Kurkowiak zasługuje, w mojej opinii, na wysoką i pozytywną ocenę. Jak już wspominałem, jest przykładem dobrze przemyślanego, o klarownej kompleksowej koncepcji projektu badawczego uwzględniającego z jednej strony określony fenotypowo model kliniczny z drugiej zaś potrzebę identyfikacji defektów molekularnych o znaczeniu patogennym. Rozprawa jest oryginalnym i samodzielnym dorobkiem naukowym doktorantki, świadczącym też o umiejętności wykorzystywania stworzonych jej szans realizacji zamierzeń naukowych oraz zdolności do współpracy z różnymi zespołami. Praca uzasadnia też wysoką ocenę Autorki jako pracownika naukowego dysponującego profesjonalnym warsztatem badawczym w zakresie genetyki molekularnej.

Biorąc powyższe pod uwagę stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny praca mgr Małgorzaty Kurkowiak odpowiada wymogom stawianym rozprawom na stopień doktora określonych w ustawie o Tytułach naukowych i stopniach naukowych z dnia 14 marca 2003 roku.

Zwracam się zatem do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Małgorzaty Kurkowiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr. hab. n. med. Tadeusz Mazurczak

Warszawa, dnia 18.09.2014 r.