

Szczecin, 8 marca 2016r.

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Pawła Borunia pt. „Opracowanie i optymalizacja nowych metod wykrywania dziedzicznych predyspozycji do występowania chorób nowotworowych”

Przedstawiona do oceny praca doktorska stanowi monotematyczny cykl trzech publikacji dotyczących opracowania nowych metod wykrywania mutacji opublikowanych w czasopismach zagranicznych o łącznym wysokim współczynniku oddziaływania IF wynoszącym 10,2. mgr Boruń jest pierwszym autorem wszystkich publikacji. Rozprawa liczy łącznie 44 strony, zawiera 3 prace oryginalne w języku angielskim, które cytują łącznie 70 pozycji piśmiennictwa, zawierają 7 tabel i 8 rycin. Praca doktorska poprzedzona spisem treści, zawiera wstęp, cele badań, omówienie wyników każdej publikacji, wnioski streszczenie w języku polskim oraz streszczenie w języku angielskim. Układ pracy oraz opracowanie graficzne są przejrzyste i starannie zredagowane. Cytowane piśmiennictwo jest aktualne i adekwatne do treści. Znacząca część ujętych referencji opublikowana została w ciągu ostatnich pięciu lat.

W ostatnich latach dokonał się ogromny postęp w badaniu sekwencji DNA. Opracowano nowoczesne i skomplikowane techniki takie jak sekwencjonowanie nowej generacji czy aCGH umożliwiające kompleksowe badanie genomu ludzkiego. W praktyce klinicznej jednak z reguły istnieje zapotrzebowanie na badanie pojedynczych genów u chorych z podejrzeniem określonych chorób genetycznych. Ponadto w populacjach homogennych genetycznie (np. populacja polska) diagnostyka genetyczna często polega na wykrywaniu jednej lub kilku mutacji założycielskich, które odpowiadają za duży odsetek wszystkich mutacji danego genu w danej populacji (np. czułość testu BRCA1 opartego o badanie kilku najczęstszych mutacji powtarzalnych genu BRCA1 w polskiej populacji wynosi około 90% w wykrywaniu wszystkich mutacji tego genu). Wobec tego, do poszukiwania mutacji w pojedynczych genach i do detekcji znanych mutacji założycielskich, istotny jest rozwój prostych i tanich testów genetycznych, których wyniki można szybko i jednoznacznie interpretować. Zatem zadanie badawcze - opracowania nowych metod wykrywania mutacji, jakiego podjął się Doktorant, ukazuje się jako bardzo ważne i aktualne.

Założenia pracy Doktorant zrealizował opracowując warunki eksperymentalne techniki HRM do wykrywania: 1) małych zmian sekwencji genu STK11; 2) małych mutacji i dużych rearanżacji w genach DMD i APC; 3) małych mutacji i dużej delecji genu CHEK2. Łącznie swoje badania przeprowadził na materiale genetycznym izolowanym z krwi obwodowej pozyskanej od ponad 500 pacjentów, w tym 41 osób z zespołem Peutza-Jeghersa, 50 osób z rodzin z Dystrofią mięśniową Duchenne'a, 50 chorych na rodzinną polipowatość gruczolakowatą, 343 pacjentek z rakiem piersi i/lub historią rodzinną nowotworów oraz 100

osób zdrowych stanowiących grupę kontrolną. Czułość opracowanych metod HRM zweryfikował przez za pomocą analiz ASA-PCR oraz multiplex-PCR oraz przez badanie kontrolnych próbek DNA od nosicieli mutacji zidentyfikowanych uprzednio sekwencjonowaniem lub MPLA.

Opracowane przez Doktoranta warunki eksperymentalne c-HRM umożliwiały wykrycie 100% mutacji uprzednio stwierdzonych za pomocą innych metod molekularno-genetycznych. Zakres przeprowadzonych badań świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu Doktoranta, zarówno teoretycznym jak i manualnym. Na podstawie dobrze zaprojektowanych i starannie wykonanych badań Doktorant wyciągnął trzy zasadne wnioski: 1) Opracowana metodyka wykrywania małych zmian sekwencji genu STK11 warunkujących zespół Peutza-Jeghersa pozwala na szybkie i skuteczne wykrycie mutacji tego genu w badanej grupie pacjentów, 2) Porównawcza analiza topnienia w wysokiej rozdzielczości (C-HRM) jest szybką, tanią i wysokoprzepustową techniką przesiewową, pozwalającą na detekcję małych zmian sekwencji i CNV w trakcie jednego badania, 3) Opracowany na podstawie analiz HRM i C-HRM test identyfikacji 4 najczęstszych mutacji genu CHEK2 jest efektywną i precyzyjną metodą detekcji docelowych zmian, ze 100% skutecznością wykrywalności uzyskaną w badanych grupach.

Lektura doktoratu jednak nasuwa kilka pytań: 1) Czy obecność pseudogenów CHEK2 nie utrudnia wykrywania mutacji 1100delC za pomocą C-HRM?; 2) Czy obecność regionów bogatych w nukleotydy CG (np. exon 1 genu VHL) nie będzie zakłócać ilościowej analizy w metodzie C-HRM? 3) Jaka liczba fragmentów może być badana techniką C-HRM?

W podsumowaniu, uważam, że forma doktoratu przygotowanego na podstawie artykułów opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych jest doskonała. Biorąc pod uwagę zawartość merytoryczną, recenzowany doktorat stanowi bardzo dobrze wykonaną pracę badawczą z użyciem nowoczesnych metod molekularno-genetycznych, gwarantujących rzetelność przedstawionych wyników.

Na uznanie zasługuje opracowanie przez doktoranta porównawczej analizy topnienia w wysokiej rozdzielczości (C-HRM), nowej metody jednoczesnego wykrywania małych mutacji i dużych rearanżacji (CNV). Metoda ta wykorzystuje dane z procesu topnienia, zamiast krzywych amplifikacji, do relatywnej kwantyfikacji. Umożliwia szybką i tanią detekcję mutacji. Może okazać się przydatnym narzędziem do wstępnych badań przesiewowych gdyż umożliwia szybką i tanią detekcję małych mutacji oraz CNV. Przedkładam wniosek o dopuszczenie mgr Borunia do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Doktorat został przygotowany na podstawie trzech publikacji w czasopismach zagranicznych (Human Genetics 2014, BMC Med Genet 2013, Mol Diagn Ther 2015) o łącznym wysokim współczynniku oddziaływania $IF = 10,2$, a pierwszym autorem wszystkich publikacji jest Doktorant. Wobec tego proszę o wyróżnienie prezentowanej rozprawy doktorskiej.

Prof. dr hab. n. med. Cezary Cybulski

