



UNIwersytet Medyczny

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Katedra i Zakład Genetyki

prof. dr hab. Maria M. Sąsiadek

Wrocław, 28. 03. 2016

Recenzja

rozprawy doktorskiej pani magister

Anety Bałabas pt. „ Opracowanie algorytmu poszukiwania predyspozycji genetycznych w genie BRCA2 ” przygotowana na podstawie decyzji Rady Naukowej Centrum Onkologii – Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie.

Rozprawa doktorska pani mgr Anety Bałabas jest wynikiem Jej badań nad występowaniem mutacji genu *BRCA2* u pacjentek z rakiem piersi lub/i jajnika. Doktorantka objęła badaniami zarówno grupę pacjentek z dziedziczną postacią raka piersi/jajnika, jak i ze sporadyczną. W zakresie Jej zainteresowań badawczych była nie tylko identyfikacja najczęstszych mutacji występujących w genie *BRCA2* u pacjentek z rakiem piersi lub/i jajnika w polskiej populacji, ale też opracowanie algorytmu diagnostycznego dla poszukiwania mutacji genu *BRCA2* u osób z podejrzeniem obciążenia zespołem dziedzicznego, zwiększonego ryzykiem zachorowania na raka piersi i jajnika

Autorka podjęła się badań nad tym problemem gdyż, mimo iż powszechnie jest znane znaczenie mutacji genu *BRCA1* w karcinogenezie raka piersi i jajnika, a szczególnie w etiologii dziedzicznego zespołu zwiększonego ryzyka zachorowania na raka piersi i jajnika to brak jest rekomendacji, ujednocających diagnostykę mutacji tego genu w Polsce.

W Polsce najczęściej jest stosowana diagnostyka polegająca na badaniu kilku wybranych mutacji genu *BRCA2*, co niewątpliwie nie jest optymalnym schematem postępowania diagnostycznego w sytuacji, kiedy w genie *BRCA2* nie ma zidentyfikowanych tzw. mutacji hot-spotowych.

Przedstawiona do recenzji praca obejmuje 87 stron z tradycyjnym podziałem na wykaz skrótów, streszczenie, wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję, wnioski oraz piśmiennictwo. Autorka zamieściła również załączniki w których wskazała na źródła finansowania pracy oraz publikacje, które powstały z wykorzystaniem wyników, uzyskanych w wyniku realizowanych przez Nią badań.

Ocena rozprawy doktorskiej:

We wstępie Autorka szczegółowo przedstawiła teoretyczne podstawy zagadnień, którymi zajęła się w swojej pracy badawczej. Pierwszy rozdział wstępu poświęciła na szczegółowe przedstawienie molekularnych podstaw procesu karcinogenezy. Kolejno, omówiła epidemiologię raka piersi i jajnika, z uwzględnieniem zarówno sytuacji w Polsce jak i w świecie. Omówiła również znaczenie egzogennych czynników ryzyka zachorowania na te nowotwory.

Następnie skupiła się na podstawowym dla Jej badań problemie dziedzicznie warunkowych zespołów zwiększonego ryzyka zachorowania na raka piersi i jajnika, omawiając zwięźle zarówno epidemiologiczne, kliniczne jak i molekularne aspekty występowania tych zespołów. Doktorantka szczegółowo i wnikliwie omówiła gen *BRCA2*, zróżnicowane funkcje białka kodowanego przez ten gen, spektrum i rozkład mutacji oraz przedstawiała rozkład mutacji zidentyfikowanych jako najczęstsze w różnych populacjach europejskich.

Kolejno, pani Bałabas omówiła nowotwory występujące u nosicieli mutacji germinalnych *BRCA2*, inne niż raki piersi i jajnika.

Znaczną część wstępu Doktorantka poświęciła na omówienie znaczenia badań molekularnych w opiece lekarskiej nad kobietami z rakiem piersi lub /i jajnika, w ramach rozwijającej się medycyny personalizowanej.

Wstęp stanowi szczegółowe i rzetelne omówienie poruszanych zagadnień, w oparciu o szeroką i aktualną literaturę i pozwala czytelnikowi na zapoznanie się z problemami, na których Doktorantka skupia się w swojej pracy badawczej. Przedstawiona wnikliwa analiza aktualnej literatury oraz sytuacji klinicznej pacjentów nie pozostawia wątpliwości, że decyzja Doktorantki o kierunku prowadzonych badań jest w pełni uzasadniona zakresem obecnej wiedzy, zarówno z naukowego, jak i medycznego punktu widzenia.

*Chciałabym podjąć polemikę z Doktorantką jedynie w jednym punkcie – otóż pani Bałabas jednoznacznie kwalifikuje gen *BRCA2* jako należący do grupy tzw. „caretakers genes”, podczas, gdy jest o gen o wielorakich funkcjach, kwalifikowany różnie jako przez różnych autorów, jako należący do grupy „caretakers” lub „gatekeepers genes”.*

Celem rozprawy doktorskiej pani mgr Bałabas było ustalenie spektrum najczęstszych mutacji genu *BRCA2* występujących u pacjentek z rakiem piersi lub/i jajnika oraz algorytmu diagnostycznego dla identyfikacji mutacji genu *BRCA2* u pacjentek podejrzanych o dziedziczne obciążenie rakiem piersi lub/i jajnika.

Doktorantka cel badawczy realizowała w trzech etapach:

1. w pierwszym etapie przeprowadziła badania przesiewowe, metodą denaturacyjnej chromatografii cieczowej (dHPLC). W tym etapie przebadła 105 pacjentek, u których rozpoznano raka piersi lub/i jajnika, a u których nie zidentyfikowano mutacji genu *BRCA1*.
2. W drugim etapie badań Doktorantka przebadła grupę 1711 chorych na raka piersi lub/i jajnika w kierunku mutacji, które zidentyfikowała w wyniku badań 1 etapu.
3. W trzecim etapie badań Autorka przeprowadziła badania amplikonów kodującej sekwencji *BRCA2*, metodą NGS u 512 kobiet, u których w badaniach 1 i 2 etapu nie znaleziono mutacji ani genu *BRCA1* ani *BRCA2*.

Projekt został pozytywnie zaopiniowany przez Komisję Etyczną przy Centrum Onkologii w Warszawie, a wszyscy badani podpisali świadomą zgodę na udział w projekcie.

W rozdziale pt. „Materiały” Doktorantka scharakteryzowała badane grupy chorych, z podziałem na grupy analizowane w kolejnych etapach Jej pracy.

W pierwszym etapie przebadła 105 chorych na raka piersi i jajnika, dla których zostało zidentyfikowane obciążenie rodzinne, a u których nie wykryto mutacji w genie *BRCA1*. W tym etapie pracy zostały przeprowadzone badania przesiewowe metodą dHPLC a badaniami objęto odcinki kodujące *BRCA2* i fragmenty przyległych do nich intronów.

W 2 etapie Doktorantka przebadła metodą dyskryminacji alleli, wszystkie zmiany w genie *BRCA2*, które zostały wykryte w badaniach I etapu. Badaniami objęła 1711 pacjentek z rakiem piersi lub/i jajnika spośród których u 1022 stwierdzono występowania raków piersi lub/i jajnika w rodzinie. Grupę kontrolną stanowiło 2291 osób zdrowych (1677 kobiet i 614 mężczyzn) z ujemnymi wynikami badań profilaktycznych w kierunku choroby nowotworowej. W tej grupie, u 1033 pacjentek stwierdzono rodzinne obciążenie występowaniem raka piersi lub/i jajnika. Grupę kontrolną stanowiło 2291 zdrowych osób (1677 kobiet i 614 mężczyzn).

W 3 etapie badań Doktorantka przeprowadziła metodą NGS genotypowanie ampliconów części kodującej genu *BRCA2* w grupie 512 kobiet z rakiem piersi lub/i jajnika u których w toku realizacji II etapu badań nie zidentyfikowała patogenicznej mutacji.

Oceniając ten fragment rozprawy doktorskiej chciałabym podkreślić, że Doktorantka niezwykle precyzyjnie dokonała wyboru pacjentów do poszczególnych grup, badanych w kolejnych etapach i szczegółowo przedstawiła wszystkie grupy. Jestem również pod wrażeniem liczebności badanych grup.

Są to podstawowe elementy, decydujące o klęsce lub sukcesie badawczym tego typu projektach. Niewłaściwie dobrane, lub zbyt mało liczne grupy stanowią jedną z najczęstszych przyczyn braku wiarygodnych wyników w pracach nad znaczeniem mutacji genów w patogenezie różnych schorzeń, w tym chorób nowotworowych.

Uważam że zarówno konstrukcja grupy badanej, jaki i jej przedstawienie przez Doktorantkę, zasługują na wysoką ocenę.

W rozdziale „Metody” pani Bałabas opisała szczegółowo stosowane metody: od izolacji DNA z komórek jądrzastych i plam krwi, pomiar stężenia DNA, amplifikację DNA (z wykazem zastosowanych primerów dla amplifikacji 48 fragmentów genu *BRCA2* do analizy dHPLC), metodę dHPLC, sekwencjonowanie met. Sangera oraz genotypowanie techniką dyskryminacji alleli. Najobszerniejszy podrozdział pani Bałabas poświęciła szczegółowemu opisowi sekwencjonowania nowej (kolejnej) generacji. Ten rozdział stanowi minikompendium wiedzy o tej metodzie sekwencjonowania DNA, a Autorka imponuje szczegółową znajomością metody.

Podsumowując, należy stwierdzić, że Doktorantka przeprowadziła badania stosując najnowocześniejsze metody badań molekularnych. Metody te zostały zastosowane z rozwagą i w sposób w pełni uzasadniony. Opis stosowanych metod jest bardzo szczegółowy, ilustrowany czytelnymi rycinami i wskazuje jednoznacznie, że Autorka jest ekspertem w prowadzeniu takich badań.

W rozdziale „Wyniki” Doktorantka omówiła szczegółowo wyniki kolejnych etapów pracy badawczej.

W toku realizacji pierwszego etapu badań, pani Bałabas analizując gen *BRCA2* u 105 pacjentek z rozpoznaniem rakiem piersi lub/i jajnika oraz obciążeniem rodzinnym nowotworami ze spektrum dziedzicznego raka piersi lub/i jajnika, zidentyfikowała 11 patogennych mutacji u 12.4% badanych. Wszystkie te mutacje zostały potwierdzone sekwencjonowaniem met. Sangera. Omawiając wyniki badań metodą dHPLC, Autorka przedstawiła profile rozdziału DNA pochodzącego od 11 pacjentek ze zidentyfikowaną mutacją wraz z profilami rozdziału DNA, stanowiącymi pozytywną i negatywną kontrolę.

Z tego etapu badań wynika również, że mutacje w genie *BRCA2* są rozmieszczone wzdłuż całego genu i tylko 1 zmianę wykryto u więcej niż u 1 pacjentki (u trzech pacjentek).

W drugim etapie badań Doktorantka przebadła bardzo dużą, nieselekcjonowaną grupę kobiet z rakiem piersi lub/i jajnika (1711 osób), metodą dyskryminacji alleli, pod kątem występowania 9 spośród zidentyfikowanych w pierwszym etapie badań 11 mutacji. Grupa kontrolna w tym etapie badań liczyła 2291 zdrowych kobiet. W grupie pacjentek Doktorantka wykryła 5 patogennych mutacji u 13 niespokrewnionych osób. Wśród obserwowanych mutacji najczęściej występowały: 5467insT, 6174delT oraz 8138del5.

Podsumowując wyniki etapy badań I i II Doktorantka stwierdziła, że mutacje genu *BRCA2* występują u około 1.4% niespokrewnionych chorych z rakiem piersi lub/i jajnika. Spośród tych badanych 23 pacjentki były obciążone występowaniem raka piersi/jajnika w rodzinie, u dwóch rozpoznano obustronny rak piersi, a jedną mutację stwierdzono u mężczyzny. W grupie kontrolnej Autorka nie stwierdziła obecności żadnej mutacji genu *BRCA2*.

W III etapie badań Doktorantka przeanalizowała metodą NGS DNA pochodzące od 512 pacjentek z rakiem piersi lub/i jajnika, u których nie wykryto mutacji w toku dwóch pierwszych etapów badań. Mutacje zidentyfikowała u 4.7% badanych. Doktorantka podkreśliła, że u 19 pacjentek ze zidentyfikowaną mutacją, raki piersi lub/i jajnika wystąpiły u krewnych, u 4 pacjentek obserwowano inne nowotwory, a jedynie 1 pacjentka nie miała obciążonego wywiadu chorobowego/rodzinnego.

Analizując wyniki badań własnych w odniesieniu do wyników badań innych polskich autorów nad występowaniem mutacji w genach *BRCA1* i *BRCA2* u pacjentek z rakiem piersi/jajnika Autorka zwróciła uwagę na fakt, że wykrywalność mutacji w genie *BRCA1* jest znacznie wyższa, niż wykrywalność mutacji genu *BRCA2*. Obserwację tą połączyła z faktem, że w polskiej populacji (podobnie, jak w populacjach powiązanych z Polską historycznie i geograficznie, jak rosyjska, węgierska, łotewska i litewska) zidentyfikowano tzw. mutacje fundatorowe (5382insC, 300T>G, 4135delA oraz 3819del5), które stanowią 60-80% wszystkich patogennych mutacji w tym genie, podczas gdy w genie *BRCA2* nie ma tego typu mutacji. Wprawdzie w niektórych ośrodkach w Polsce badanych jest kilka (najczęściej trzy) mutacje genu *BRCA2*, ale ze względu na fakt braku mutacji fundatorowych w tym genie, wyniki tych badań nie przedstawiają rzeczywistej częstości występowania mutacji w omawianym genie.

Autorka następnie zanalizowała stosowane przez siebie metody badania genu *BRCA2* pod kątem ich pracochłonności, kosztów wykonania i efektywności diagnostycznej i zaproponowała optymalny w Jej

ocenie algorytm postępowania dla osób z rakiem piersi/jajnika, podejrzanych o dziedziczne obciążenie ryzykiem zachorowania na re nowotwory.

W skrócie, Doktorantka proponuje:

1. U każdej chorej z rakiem piersi/jajnika wykonanie badań w kierunku mutacji fundatorowych w genie *BRCA1*.
2. U tych wszystkich pacjentek, u których na podstawie analizy rodowodowo-klinicznej można postawić podejrzenie obciążenia dziedzicznego omawianymi nowotworami, a u których nie wykryto mutacji, należy przeprowadzić sekwencjonowanie (met. NGS) części kodujących genów *BRCA1* i *BRCA2*.
3. Jeśli zostanie zidentyfikowana patogenna mutacja, należy objąć badaniami członków rodziny.
4. Po wykryciu patogenicznej mutacji, wynik należy zweryfikować sekwencjonowaniem metodą Sanger.

W podsumowaniu Autorka podkreśliła konieczność standaryzacji zarówno wskazań do badania, jak i metod stosowanych w Polsce dla wykrywania patogennych mutacji genów *BRCA1* i *BRCA2*.

Podkreśliła znaczenie, jakie wykrycie mutacji ma dla osoby chorej, członków jej rodziny oraz jakie są konsekwencje społeczne niewłaściwie prowadzonej diagnostyki.

W tym miejscu chciałabym przedyskutować z Doktorantką jeden aspekt proponowanego przez nią schematu postępowania. Otóż w mojej opinii powinna najpierw zostać przeprowadzona weryfikacja mutacji u probandki, a badania dla rodziny powinny być oferowane dopiero, gdy mamy pewność co do charakteru zmiany u osoby chorej.

Doktorantka powołuje się na 123 pozycje literaturowe. Jest to aktualna literatura (w większości opublikowana w ostatnich 10 latach) i dotycząca sedna poruszanych zagadnień. Ta duża, ale mieszcząca się w „granicach rozsądku” liczba cytowanych publikacji dowodzi znajomości przez Doktorantkę literatury przedmiotu, umiejętności korzystania z licznych i różnorodnych źródeł wiedzy, świadcząc jednocześnie o Jej umiejętności krytycznej oceny źródeł.

Autorka dołączyła informację o źródłach finansowania badań (grant MNiSW) oraz kopie trzech artykułów w których zostały opublikowane wyniki jej pracy badawczej. Wszystkie te publikacje znalazły się w czasopiśmie o wysokim współczynniku wpływu.

Podsumowując analizę przedstawionej do oceny, rozprawy należy podkreślić, że całość badań została bardzo profesjonalnie nie tylko przeprowadzona, ale i przedstawiona. Autorka zilustrowała rozprawę czytelnymi ilustracjami oraz dobrze skonstruowanymi tabelami. Nie mam też zastrzeżeń redakcyjnych (za wyjątkiem jedne uwagi – moim zdaniem zgoda na badania powinna być „świadome”, a nie „uświadomiona”).

W mojej ocenie rozprawa doktorska mgr Anety Bałabas spełnia wymogi, stawiane tego typu rozprawom i zwracam się do Rady Naukowej Centrum Onkologii – Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie. o dopuszczenie pani magister Anny Bałabas do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz o wyróżnienie jej pracy nagrodą.

Chciałabym, w uzasadnieniu wniosku o wyróżnienie dysertacji, podkreślić, że zarówno cel pracy Doktorantki, zakres i sposób przeprowadzonych badań, waga uzyskanych wyników oraz znaczenie opublikowanych artykułów znacznie przewyższają wymogi, jakie są stawiane rozprawom doktorskim.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD GENETYKI
kierownik
Prof. dr hab. Maria M. Sasiadek