

prof. dr hab. Michał Witt
Zakład Genetyki Molekularnej i Klinicznej
Instytut Genetyki Człowieka PAN
ul. Strzeszyńska 32
60-479 Poznań



RECENZJA

**pracy doktorskiej mgr Mateusza Dawidziuka
pt.**

**"Molekularna identyfikacja oraz charakterystyka genów odpowiedzialnych za rozwój
mózgu w badaniach genomowych pacjentów z małogłowie"**

Przedstawiona do oceny praca doktorska poświęcona jest identyfikacji i analizie genów związanych z powstawaniem małogłowa. Powstała w Zakładzie Genetyki Medycznej, Zespole Pracowni Genetyki Molekularnej, Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie pod promotorskim okiem dr. hab. Wojciecha Wiszniewskiego, przy współudziale dr. Pawła Gawlińskiego jako promotora pomocniczego.

Na obecnym etapie rozwoju genetyki niezwykle istotnym i bardzo pojętnym tematem badań są wszelkie cechy o wieloczynnikowej patogenezie, z reguły również z genetycznego punktu widzenia warunkowane wielogenowo, a w każdym razie genetycznie heterogenne. Do tej bardzo licznej kategorii należą wszelkiego typu zespoły wad wrodzonych czy niepełnosprawność intelektualna, występująca jako wada izolowana lub jako składowa symptomatologii wcześniej wymienionych. Do tej kategorii należy także małogłowie jako stosunkowo częste zaburzenie neurorozwojowe. Częstość występowania małogłowa w populacji europejskiej wynosi ok. 4/10.000; pomniejszona głowa jest skutkiem nieprawidłowości w rozwoju mózgu, które powodują zahamowanie jego wzrostu i zmniejszoną objętość. Nieprawidłowości obserwowane u pacjentów z tą wadą mogą być ograniczone tylko do procesów związanych z rozwojem mózgu skutkujących zmniejszoną objętością mózgu i zazwyczaj niepełnosprawnością intelektualną (małogłowie izolowane) lub mogą być powiązane z innymi wadami wrodzonymi (małogłowie syndromiczne). Obok małogłowa powodowanego wpływami

środowiskowymi (wirusy TORCH, wpływ alkoholu i niektórych leków w czasie ciąży, niekorzystne czynniki socjodemograficzne itp.), małogłowie o podłożu genetycznym stanowi około 30% przypadków występowania tej wady, zaś molekularną diagnozę podłoża małogłowia udaje się ustalić u 15% – 50% pacjentów, u których podejrzewa się podłoże genetyczne wady. Do tej pory zidentyfikowano paręnaście genów związanych z występowaniem małogłowia pierwotnego; ten w najlepszym razie połowiczny sukces w diagnostyce molekularnej wady w pełni uzasadnia podejmowanie działań na rzecz identyfikacji kolejnych genów i mutacji z nią związanych. Obecnie dostępne metody genomiczne pozwalają na prowadzenie tego typu badań z dużą skutecznością.

Rozprawa doktorska p. Dawidziuka zawiera 131 stron i skonstruowana jest w sposób typowy dla prac promocyjnych. Rozpoczyna ją obszerny wstęp literaturowy, w którym Autor opisuje rozwój mózgu człowieka, małogłowie jako problem medyczny, różnorodne mechanizmy prowadzące do powstania małogłowia, jak zaburzenia funkcji centrosomu, defekty mikrotubularne, dysfunkcje komórkowego systemu naprawy uszkodzeń DNA; ponadto porusza problemy diagnostyczne związane z małogłowiem oraz opisuje modele zwierzęce do jego badania, głównie model danio pręgowanego. O ile większość podrozdziałów wstępu zawiera sporo ciekawych informacji, o tyle podrozdział dotyczący rozwoju mózgu wydaje się tu nieproporcjonalnie obszerny, tym bardziej że nie dotyczy bezpośrednio tematu pracy doktorskiej. Sugeruję również używanie terminu „genom człowieka” w miejsce „genom ludzki”. Informacja zawarta na str. 30 mylnie sugeruje, że pierwotna dyskineza rzęsek (PCD) powodowana jest mutacjami genu *DNAI1* – w rzeczywistości to jeden z ok. 40 genów, których mutacje powodują tę chorobę, a genem którego mutacje powodują najwięcej przypadków PCD jest *DNAH5*.

Cele pracy są cztery. Pierwszy polegający na zrekrutowaniu kohorty dzieci z dobrze zdefiniowanym klinicznie małogłowiem, trudno uznać za cel naukowy sam w sobie – to po prostu zebranie właściwej grupy badanej, co jest zawsze punktem wyjścia dla tego typu badań. Nie jest nim również cel drugi, gdyż przydatność techniki sekwencjonowania eksomowego w kontekście diagnozy podłoża molekularnego małogłowia jest oczywista i dobrze znana z literatury, więc nie wymagała ona dalszej weryfikacji, a jedynie skutecznego zastosowania, co zostało przez Doktoranta zrobione. Właściwymi celami pracy doktorskiej są dopiero dwa kolejne (dotyczące identyfikacji genów i ich funkcjonalnego modelowania w

danio pręgowanym), choć rozpoczynanie każdego z nich od słowa „próba” jest chyba nadmiarem ostrożności.

Wykorzystując technikę sekwencjonowania eksomowego Doktorant ustalił podłoże molekularne małopłowa u 62 ze 129 probantów poprzez identyfikację mutacji w znanych genach warunkujących wystąpienie małopłowa, a także wykrył potencjalnie patogenne mutacje w 11 genach do tej pory nieopisanych, a mianowicie: *CELSR1*, *DHX9*, *ELFN1*, *KCNH3*, *MSI1*, *PCDHGA11*, *PCMI*, *PTPRS*, *SMPD4*, *SUPV3L1*, *TUBGCP2*. Rodziny z trzema ostatnimi zostały bliżej opisane pod względem klinicznym i genetycznym. Doktorant przeprowadził następnie analizę funkcjonalną genu *smpd4*, ortologu *SMPD4*. W celu wizualizacji przestrzennej ekspresji genu *smpd4* w zarodkach danio pręgowanego wykorzystał metodę hybrydyzacji *in situ* całego zarodka WISH z użyciem specyficznej antysensownej sondy RNA i stwierdził, że do jego ekspresji dochodzi w rejonie głowy zarodka oraz rozwijającego się układu pokarmowego i serca. Przeprowadził następnie badania wpływu wyciszenia genu *smpd4* (knockdown) na rozwój zarodkowy przy użyciu odpowiednio dobranych morfolino – analiza trzydniowych zarodków z wyciszonym *smpd4* wykazała uzyskanie fenotypu zbliżonego w swej charakterystyce do zespołu cech małopłowa (skrócenie wymiarów głowy i całego ciała). Przedstawione wyniki i ich analiza pokazują, że geny *SMPD4*, *SUPV3L1*, *TUBGCP2* są realnymi kandydatami na geny związane z patologią małopłowa. Są to dane naukowo ważne i istotne w naszym poznawaniu podstaw molekularnych chorób wynikających z zaburzeń rozwoju embrionalnego. Szczególnie analiza funkcjonalna *SMPD4* jest niezwykle przekonująca – uzyskane obrazy zaburzonych rozwojowo zarodków użytego modelu zwierzęcego to duże osiągnięcie. Żałować należy, że analizie takiej poddany został tylko jeden wyłoniony gen-kandydat, a nie cała trójka.

Pracę wieńczy dyskusja, która w bardzo konkretny sposób wyargumentowuje tezę Autora o potencjalnym znaczeniu wybranej trójki genów jako genów-kandydatów związanych z powstawaniem małopłowa. Przedstawione na zakończenie wnioski obarczone są tym samym grzechem co cele pracy (patrz str. 2 niniejszej recenzji). Ponadto są one sformułowane niezwykle lakonicznie i nie ujmują wystarczająco dobitnie faktycznych osiągnięć pracy, które są niebagatelne i godne dużego uznania.

Doktorant jest współautorem trzech prac w poważnych czasopismach naukowych, we wszystkich jest autorem w środku listy. Jedna praca oczekuje na decyzje edytorskie. Recenzenta dziwi fakt, że tak ciekawe i wartościowe wyniki jak te zamieszczone w

przedmiotowej rozprawie doktorskiej p. Mateusza Dawidziuka nie zostały dotąd opublikowane z Doktorantem jako pierwszym autorem.

Z recenzenckiego obowiązku chciałem zwrócić uwagę na drobne niedociągnięcia językowe: str. 56 mutacje typu *de novo* to po prostu mutacje *de novo*, str. 59 badania obrazowe mózgu w postaci tomografii itd, to po prostu badania metodą tomografii.

W podsumowaniu chciałbym stwierdzić, że rozprawa doktorska mgr. Mateusza Dawidziuka spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2014 r. poz. 1852 oraz z 2015 r. poz. 249 i 1767). W związku z powyższym **wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie o dopuszczenie mgr. Mateusza Dawidziuka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**



Poznań, 20 czerwca 2019 r.