

Ocena

Rozprawy na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych
i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne Pani mgr Kingi Sałacińskiej

„Badanie podłoża genetycznego wrodzonej łamliwości kości z zastosowaniem metody sekwencjonowania następnej generacji (NGS)”

Wrodzona łamliwość kości jest rzadką, genetycznie uwarunkowaną chorobą, wynikającą najczęściej z nieprawidłowości ilościowych lub jakościowych w obrębie cząsteczek kolagenu typu I. Schorzenie to związane jest z niską masą kostną skutkującą występowaniem licznych złamań niskoenergetycznych lub złamań w nietypowych miejscach. W obrazie klinicznym tej choroby znajduje się również niedobór wzrostu, cechy dysmorficzne twarzoczaszki, łukowate wygięcia kości długich, deformacje klatki piersiowej oraz kręgosłupa. Ponadto pacjenci z wrodzoną łamliwością kości mogą prezentować objawy pozaszkieletowe obejmujące niebieskie zabarwienie twardówek, utratę słuchu, zaburzenia rozwoju zębów, wiotkość stawów, zmniejszoną pojemność płuc oraz niedomykalność zastawek serca. Ze względu na szerokie spektrum objawów klinicznych charakteryzujących to schorzenie oraz zróżnicowane ich nasilenie, fenotyp pacjentów z wrodzoną łamliwością kości jest bardzo heterogeny. Choroba może mieć przebieg niemal bezobjawowy lub skapoobjawowy, ale i bardzo ciężki, skutkujący śmiercią w okresie prenatalnym. Próbą systematyzacji tego zróżnicowanego przebiegu klinicznego wrodzonej łamliwości kości było wyodrębnienie pięciu głównych fenotypów tego schorzenia w oparciu o cechy kliniczne i radiologiczne, bez uwzględnienia podłoża genetycznego. Uwarunkowanie molekularne tej choroby jest bowiem również heterogenne, co pociąga za sobą trudności w interpretacji związków genotypowo-fenotypowych. Wprawdzie najczęstszą przyczyną wrodzonej łamliwości kości są heterozygotyczne warianty zlokalizowane w genach *COL1A1* i *COL1A2*, które kodują białka kolagenu typu I, to jednak zwykle są to warianty niepowtarzające się u osób niespokrewnionych. Ponadto obraz kliniczny choroby u nosicieli nawet tego samego patogennego wariantu może się wyraźnie różnić. Dodatkowo, wrodzona łamliwość kości bywa uwarunkowana defektami zlokalizowanymi w tzw. „genach niekolagenowych”. Z tego powodu badanie związku genotypu z przebiegiem klinicznym tej choroby jest wymagające i powinno odbywać się na odpowiednio reprezentatywnej grupie pacjentów, u których precyzyjnie zdefiniowano fenotyp i wykonano analizę całej sekwencji kodującej genów powiązanych z patogenezą choroby. Następnie zastosowano odpowiednie narzędzia bioinformatyczne w

celu właściwej interpretacji zidentyfikowanych wariantów. Wiadomo bowiem z wcześniejszych badań nad wrodzoną łamliwością kości, iż istnieją pewne zależności między występującym wariantem w genie *COL1A1* lub *COL1A2*, a obrazem klinicznym pacjenta. Ekspresja cech klinicznych może zależeć od: rodzaju wariantu i jego efektu na cząsteczki kolagenu, genu objętego defektem, lokalizacji zmiany oraz aminokwasu ulegającego substytucji w miejsce glicyny w łańcuchu polipeptydowym kolagenu. Niemniej jednak, żaden z dotychczas proponowanych modeli predykujących fenotyp pacjenta z wrodzoną łamliwością kości na podstawie zidentyfikowanego u niego sprawczego defektu genetycznego, nie okazał się w pełni skuteczny. W tym świetle, poszukiwanie związku pomiędzy fenotypem a genotypem pacjentów z rozpoznaniem wrodzonej łamliwości kości wydaje się bardzo interesujące z naukowego i klinicznego punktu widzenia. I właśnie badaniu takiej zależności poświęcona jest niniejsza rozprawa doktorska.

Rada Naukowa Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi powierzyła mi rolę recenzentki rozprawy doktorskiej Pani mgr Kingi Sałacińskiej.

Rozprawę Pani mgr Kingi Sałacińskiej otrzymałem w postaci cyklu trzech publikacji dotyczących poszukiwania genetycznego podłoża wrodzonej łamliwości kości, ze szczególnym uwzględnieniem związku genotypu z fenotypem pacjenta. Te publikacje uzupełnione zostały wstępem i celami pracy, opisem metodyki i wyników oraz podsumowane wnioskami, streszczeniem w języku polskim i angielskim. Dodatkowo, opisano szczegółowo udział Doktorantki w każdej z publikacji.

We wstępie Autorka przedstawia aktualną klasyfikację kliniczną wrodzonej łamliwości kości, krótko charakteryzując poszczególne jej podtypy. Następnie opisuje podłoże genetyczne tej choroby oraz odwołuje się do aktualnego wglądu w zależności genotypowo – fenotypowe. Kolejny rozdział jest poświęcony aspektom diagnostycznym osteogenesis imperfecta, z uwzględnieniem ograniczeń interpretacyjnych wyników uzyskanych w toku analizy poszczególnymi metodami molekularnymi. Na koniec doktorantka opisuje możliwości nowoczesnego leczenia tej choroby. Tak przygotowane wprowadzenie pozwala czytelnikowi zrozumieć założenia i cele rozprawy, które zostały umieszczone na kolejnych stronach pracy.

Doktorantka założyła sobie bardzo ambitne cele pracy, którymi było: określenie podłoża genetycznego w grupie polskich pacjentów z wrodzoną łamliwością kości, poszukiwanie zmienności genetycznej w genach kolagenu typu I, ustalenie związku genotypu z obserwowanym efektem fenotypowym u pacjentów z potwierdzeniem molekularnym choroby oraz ocena skuteczności metody sekwencjonowania następnej generacji w diagnostyce wrodzonej łamliwości kości.

Grupę badaną stanowiło 197 pacjentów (180 rodzin) z podejrzeniem wrodzonej łamliwości kości, rekrutowanych przez sześć jednostek medycznych w latach 2016-2022.

Badania uzyskały zgodę Komisji Bioetycznej przy Instytucie Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi numer 108/2015.

Dokumentację realizacji założonych celów rozprawy doktorskiej stanowi cykl prac (o łącznym wskaźniku Impact Factor: 11,972 oraz łącznej punktacji MNiSW: 270), na który składały się następujące publikacje:

- Sałacińska K, Pinkier I, Rutkowska L, Chlebna-Sokół D, Jakubowska-Pietkiewicz E, Michałus I, Kępczyński Ł, Salachna D, Wieczorek-Cichecka N, Piotrowicz M, Chilarska T, Jamsheer A, Matusik P, Wilk M, Petriczko E, Giżewska M, Stecewicz I, Walczak M, Rybak-Krzyszowska M, Lewiński A, Gach A. NGS analysis of collagen type I genes in Polish patients with Osteogenesis imperfecta: a nationwide multicenter study. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023 Sep 22;14:1149982. PMID: 37810882. (IF= 5.2, MNiSW=100)
- Sałacińska K, Pinkier I, Rutkowska L, Chlebna-Sokół D, Jakubowska-Pietkiewicz E, Michałus I, Kępczyński Ł, Salachna D, Jamsheer A, Bukowska-Olech E, Jaszczuk I, Jakubowski L, Gach A. Novel Mutations Within Collagen Alpha1(I) and Alpha2(I) Ligand-Binding Sites, Broadening the Spectrum of Osteogenesis Imperfecta - Current Insights Into Collagen Type I Lethal Regions. *Front Genet*. 2021 Jul 9;12:692978. PMID: 34306033. (IF=4.772, MNiSW=100)
- Sałacińska K, Michałus I, Pinkier I, Rutkowska L, Chlebna-Sokół D, Jakubowska-Pietkiewicz E, Kępczyński Ł, Salachna D, Gach A. The first glycine-to-tryptophan substitution in the COL1A1 gene identified in a patient with progressively-deforming Osteogenesis imperfecta. *Mol Genet Genomic Med*. 2022 Aug;10(8):e1996. PMID: 35748117. (IF=2.0, MNiSW=70)

W cyklu prac, dwie pierwsze to publikacje o charakterze oryginalnych doniesień naukowych publikowane w czasopiśmie anglojęzycznym, trzecia publikacja to opis przypadku, również opublikowany w czasopiśmie anglojęzycznym. We wszystkich trzech publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem.

Pierwsza z publikacji ma charakter publikacji oryginalnej. W pracy tej przedstawiono wyniki analizy wariantów w genach kolagenu typu I w grupie 197 polskich pacjentów z wrodzoną łamliwością kości z zastosowaniem metody NGS i MLPA. Jest to praca podsumowująca projekt naukowy 2016/IV/57-MN pt. "Genetyczne uwarunkowania wrodzonej łamliwości kości", realizowany w latach 2016-2021. Na uwagę zasługuje fakt, iż badana kohorta stanowi drugą najliczniejszą grupę poddaną tego typu testowaniu wśród populacji europejskich. W wyniku przeprowadzonych badań udało się badaczom zidentyfikować warianty sprawcze u znacznej większości 108 badanych rodzin (119 pacjentów): metodą NGS w 106, metodą MLPA w dwóch przypadkach. Ponadto aż 38 wariantów stanowiły nowe, nieraportowane wcześniej zmiany: 24 w genie *COL1A1*, 14 w genie *COL1A2*. Niezwykle interesująca obserwacja dotyczyła również wykrycia siedmiu różnych zmian zlokalizowanych w tzw. „regionach letalnych” genów kolagenu typu I u chorych, którzy nie prezentowali najcięższej - letalnej formy wrodzonej łamliwości kości. W publikacji przeprowadzono również analizę genotypowo-fenotypową u 55 pacjentów z typem 1, 23 z typem 4, 38 z typem 3 oraz trzech z typem 2 choroby.

Analiza ta doprowadziła do wniosków, iż wybrane cechy kliniczne tj. deformacje obecne w okresie prenatalnym, złamania kręgów, trójkątny kształt twarzy, dentinogenesis imperfecta, ograniczenia mobilności, deformacje klatki piersiowej oraz kości długich mogą być uznane za charakterystyczne dla poszczególnych typów choroby. W opinii recenzenta, wyniki tego badania mogą stanowić podstawę do kolejnych dociekań naukowych nad związkiem genotypu z fenotypem u pacjentów z rozpoznaniem wrodzonej łamliwości kości, ponieważ nie tylko poszerzają bazę zidentyfikowanych wariantów patogennych u pacjentów, ale również pozycjonują je w określonym kontekście klinicznym. Badania doktoranta wpisują się w tym aspekcie w aktualnie prowadzone prace publikowane przez inne grupy badawcze na świecie.

W kolejnej oryginalnej publikacji, Autorka kontynuowała i pogłębiała zrozumienie klinicznego efektu nosicielstwa patogennych wariantów zlokalizowanych w „regionach letalnych” genów kolagenu typu I u chorych prezentujących nieletalne formy choroby. W tym celu Doktorantka oparła się nie tylko o własne wyniki pochodzące z analiz we wcześniej opublikowanej kohorcie chorych z wrodzoną łamliwością kości, ale również włączyła do analiz dane genotypowo-fenotypowe pochodzące z różnych populacji dostępne w bazie OIVD. Ta druga część pracy wymagała analizy ponad trzech tysięcy wariantów zgłoszonych do bazy OIVD do stycznia 2020 roku. Badanie to doprowadziło doktorantkę do wniosku, iż istnieją różnice w częstości występowania oraz nasileniu postaci choroby dla poszczególnych aminokwasów zlokalizowanych w „regionach letalnych” zarówno genu *COL1A1* jak i *COL1A2*. Poszczególne substytucje, ich umiejscowienie, wpływ na steryczność cząsteczki, a co za tym idzie interakcje z innymi białkami oraz konsekwencje fenotypowe zostały szczegółowo przeanalizowane i podsumowane. Na uznanie zasługuje wielokierunkowe podejście do tematu predykcji patogenności wariantów w genach kolagenu typu I i wykorzystanie możliwie bogatego źródła danych i narzędzi ogólnie dostępnych, aby weryfikować hipotezy, których punktem wyjścia były mniej liczne grupy chorych. Identyfikacja wariantów o silnym związku z postacią letalną choroby ma ogromne znaczenie dla poradnictwa genetycznego, dlatego doceniam kierunek i jakość opisanych analiz. Szczególnie, że Doktorantka bardzo dojrzałe i wnikliwie omawia ten problem we fragmencie dyskusji dotyczącym praktycznego zastosowania wniosków wynikających z przeprowadzonych badań w prenatalnym poradnictwie genetycznym i wskazuje na istotną wartość interpretowania wyników NGS genów *COL1A1* i *COL1A2* w kontekście konkretnych cech fenotypu płodu ujawnionych w badaniu obrazowym.

Ten aspekt pracy doktorskiej rozbudowuje ostatnia publikacja z cyklu przedstawionego do rozprawy, będąca pierwszym opisem fenotypu postępująco-deformującej postaci wrodzonej łamliwości kości u nosicielki wariantu powodującego substytucję glicyny na tryptofan w genie *COL1A1*. Zidentyfikowany wariant jest unikatowy ze względu na swoje umiejscowienie i konsekwencje dla struktury przestrzennej białka kolagenu, jakie powoduje. Wariant ten nie był wcześniej odnotowany w populacyjnych bazach danych. Bardzo ciekawym elementem tej pracy ujawniającym wszechstronne podejście Doktorantki do interpretacji wariantów genowych było wykonanie porównawczej analiza wielosekwencyjnej, która potwierdziła konserwatywność ewolucyjną

wykrytego defektu. Przedstawiony przypadek przemawia za słusznością przedstawianego wcześniej założenia, iż nasilenie objawów wrodzonej łamliwości kości uwarunkowanej defektami w genach dla kolagenu typu I zależy od podobieństwa między cząsteczką glicyny a podstawiającym ją aminokwasem.

Ogólnie, tak pod względem merytorycznej zawartości, poprawności zaplanowania badań, ich przeprowadzenia, jak również pod względem ogólnej formy i organizacji treści cykl prac oceniam bardzo wysoko.

Chociaż w całości rozprawa nie budzi wątpliwości w zakresie oryginalności tematyki badawczej, zastosowanej metodyki badań czy interpretacji wyników tych badań, pragnę - z obowiązku recenzenta - przedstawić Doktorantce moje sugestie i pytania:

- We wstępie dotyczącym metod diagnostycznych wrodzonej łamliwości kości wartościowe mogłoby być omówienie różnicy w jakości wyniku sekwencjonowania NGS, związanej z głębokością odczytu, w ramach dedykowanego chorobie panelu genów względem standardowej jakości badania WES. To może mieć istotne znaczenie kliniczne w przypadkach poszukiwania mozaikowej formy nosicielstwa defektów w genie *COL1A1* lub *COL1A2* u zdrowego rodzica chorego potomstwa. W tym miejscu można by również krótko omówić stan wiedzy dotyczący mozaicyzmu w zakresie patogennych wariantów w genach dla kolagenu typu I i jego znaczenie.

- W publikacji 1, n=107 pacjentów z 96 rodzin miało rozpoznany typ 1 wrodzonej łamliwości kości i u 42% z nich zidentyfikowano wariant patogenny. W tej sytuacji bardzo przydatna byłaby analiza cech klinicznych, jakie prezentowali pacjenci ze zidentyfikowanym wariantem w stosunku do tych, u których nie ujawniono zmiany sprawczej. W tabeli 4 w manuskrypcie cechy kliniczne są przedstawione wyłącznie dla chorych z rozpoznaniem molekularnym typu I. W przyszłości taka analiza mogłaby być pomocna w definiowaniu wskazań do badania NGS przy podejrzeniu najczęstszego w populacji, łagodnego typu wrodzonej łamliwości kości. Mam świadomość, że ta część badania w mniejszym stopniu odpowiada głównym kompetencjom doktorantki i zależy od współpracy z lekarzami genetykami, dlatego moja uwaga nie jest zarzutem, a jedynie sugestią jednej z możliwych ścieżek dalszego rozwoju tematu.

- W publikacji 2 Autorka pisze, że prawdopodobnie efekt fenotypowy poszczególnych wariantów w regionach letalnych genów *COL1A1* i *COL1A2* może również wynikać z ich wpływu na interakcje kolagenu z innymi białkami macierzy pozakomórkowej. Zastanawiam się czy to stwierdzenie jest oparte o wyniki badań funkcjonalnych, jeśli tak, to interesujące byłoby opisanie w jakich modelach były przeprowadzane, jakie są zalety i ograniczenia interpretacji wyników takich badań funkcjonalnych. Wartościowe byłoby również przedstawienie roli badań molekularnych w dalszej perspektywie eksploracji związków genotypowo - fenotypowych u pacjentów z wrodzoną łamliwością kości.

Przytoczone powyżej uwagi nie umniejszają w żadnym stopniu wartości merytorycznej rozprawy i mojej bardzo pozytywnej opinii o wyróżniającej się pracy Pani Kingi Sałacińskiej.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedłożona rozprawa jest świadectwem, iż Doktorantka wykazała umiejętność samodzielnego rozwiązywania problemów naukowych i badawczych, wykazując potrzebną do tego wiedzę, jak i przygotowanie teoretyczne w zakresie zagadnień, których rozprawa dotyczy. Praca ta zawiera bez wątpienia elementy nowości naukowej, a przedstawione wyniki wskazują, że cele badawcze stawiane przez Doktorantkę zostały zrealizowane nawet z nadwyżką. Praca stanowi dowód, iż Autorka w kompetentny sposób zgromadziła wyniki swoich obserwacji oraz w dojrzały sposób je zweryfikowała. Wymiernym rezultatem badań są publikacje, z pewnością poddane już wcześniejszej wnikliwej ocenie przez recenzentów.

Uwzględniając warsztat badawczy, wartości poznawcze i znaczenie praktyczne dociekań naukowych z prawdziwą przyjemnością przedkładam Radzie Naukowej Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi wniosek o dopuszczenie Pani mgr Kingi Sałacińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz publicznej obrony pracy doktorskiej.

Przedłożona rozprawa spełnia w pełni warunki ustawy. Jednocześnie, ze względu na nowatorskie obserwacje i koncepcje badawcze, leżące u źródeł ocenianej pracy, które pozwoliły na publikację wyników w czasopiśmie z listy filadelfijskiej wnioskuję o wyróżnienie pracy.

dr n.med. Agata Pastorczak
specjalista pediatrii i genetyki klinicznej
2326281

Łódź, dnia 12 grudnia 2023 roku