



**INSTYTUT CENTRUM ZDROWIA MATKI POLKI
w Łodzi**

mgr Kinga Sałacińska

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

Rozprawa na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych
i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: dr hab. n. med. Agnieszka Gach, prof. instytutu

Pracę wykonano w Zakładzie Genetyki
Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi

Łódź, 2023r.

Składam serdeczne podziękowania

Pani Profesor Agnieszce Gach

*za motywację do podejmowania wyzwań, ogromną życzliwość, poświęcony czas
oraz nieocenioną pomoc okazaną na każdym etapie realizacji niniejszej pracy.*

Wszystkim Współautorom,

*a w szczególności Zespołowi Poradni i Zakładowi Genetyki
za okazaną pomoc, wsparcie oraz wkład włożony w realizację projektu badawczego,
który stał się podstawą do powstania niniejszej pracy.*

Spis treści

1. Wykaz stosowanych skrótów.....	5
2. Wykaz publikacji.....	6
3. Wstęp.....	8
3.1. Charakterystyka i opis kliniczny wrodzonej łamliwości kości.....	8
3.2. Podłoże genetyczne.....	13
3.3. Poszukiwanie korelacji genotypowo-fenotypowej.....	15
3.4. Diagnostyka molekularna choroby.....	18
3.5. Leczenie.....	22
4. Cele pracy.....	27
5. Materiał i metody.....	28
5.1. Grupa badana.....	28
5.2. Izolacja materiału genetycznego.....	29
5.3. Sekwencjonowanie następnej generacji.....	29
5.4. Analiza bioinformatyczna, filtrowanie i klasyfikacja wariantów.....	31
5.5. Sekwencjonowanie metodą Sanger.....	32
5.6. Analiza liczby kopii.....	32
5.7. Analiza statystyczna.....	32
5.8. Analiza „regionów letalnych” z wykorzystaniem zasobów bazy OIVD.....	33
6. Omówienie wyników przedstawionych w cyklu publikacji.....	34
6.1. Charakterystyka badanej populacji.....	34
6.2. Podłoże genetyczne.....	35
6.2.1. Charakterystyka podłoża genetycznego w badanej grupie pacjentów.....	35
6.2.2. Analiza zmian zidentyfikowanych w genach kolagenu typu I.....	35
6.2.3. Nowe warianty.....	37
6.2.4. Analiza zmian zlokalizowanych w „regionach letalnych”.....	37
6.2.5. Pacjenci z dwoma wariantami w genach kolagenu typu I.....	37
6.3. Analiza fenotypowa pacjentów z potwierdzoną przyczyną choroby.....	37
6.4. Analiza zmian zlokalizowanych w „regionach letalnych” zidentyfikowanych w badanej grupie pacjentów.....	39
6.4.1. Opis kliniczny pacjentów.....	39
6.4.2. Charakterystyka i klasyfikacja zidentyfikowanych wariantów.....	40
6.5. Analiza „regionów letalnych” z wykorzystaniem zasobów bazy OIVD.....	40

6.5.1. Charakterystyka wszystkich wariantów w obrębie „regionów letalnych”.....	41
6.5.2. Analiza i lokalizacja wszystkich wariantów w genach kolagenu typu I związanych z występowaniem formy letalnej.....	42
6.6. Zaraportowanie pierwszej substytucji glicyny na tryptofan w genie <i>COL1A1</i> ...	45
6.6.1. Opis kliniczny.....	45
6.6.2. Charakterystyka zidentyfikowanego wariantu.....	46
7. Podsumowanie.....	47
8. Wnioski.....	52
9. Piśmiennictwo.....	53
10. Streszczenie w języku polskim.....	56
11. Streszczenie w języku angielskim.....	58
12. Wydrukowane publikacje	60
13. Zgoda Komisji Bioetycznej.....	91
14. Oświadczenia autorów.....	93

1. Wykaz stosowanych skrótów

ACMG – Amerykańskie Kolegium Genetyki Medycznej i Genomiki (ang. American College of Medical Genetics and Genomics)

BMD – gęstość mineralna kości (ang. Body Mineral Density)

CNV – zmiana liczby kopii DNA (ang. Copy Number Variation)

DI – grupa uwarunkowanych genetycznie zaburzeń rozwoju zębów (dentinogenesis imperfecta)

HGMD – baza wariantów genów człowieka (ang. Human Gene Mutation Database)

IGV – program do wizualizacji danych genomowych (ang. Integrative Genomics Viewer)

LOVD – baza wariantów Uniwersytetu Leiden (ang. Leiden Open Variation Database)

MLBR – główny region wiązania ligandów (ang. Major Ligand-Binding Region)

MLPA – multipleksowa zależna od ligacji amplifikacja sond (ang. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)

MSA – porównawcza analiza wielosekwencyjna (ang. Multiple Sequence Alignment)

NGS – sekwencjonowanie następnej generacji (ang. Next Generation Sequencing)

NMD – mechanizm usuwania skróconych transkryptów mRNA (ang. Nonsense-mediated decay)

OI – wrodzona łamliwość kości (osteogenesis imperfecta)

OIVD – baza wariantów związanych z wrodzoną łamliwością kości (ang. Osteogenesis Imperfecta Variant Database)

OMIM – elektroniczna baza chorób człowieka uwarunkowanych genetycznie (ang. Online Mendelian Inheritance in Man)

WES – sekwencjonowanie całoksomowe (ang. Whole Exome Sequencing)

WGS – sekwencjonowanie całogenomowe (ang. Whole Genome Sequencing)

2. Wykaz publikacji

Poniższy cykl publikacji będący podstawą postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora składa się z dwóch oryginalnych artykułów naukowych oraz jednego opisu przypadku. Wszystkie prace opublikowano w czasopismach umieszczonych w wykazie ministerialnym.

Publikacja 1

Salacińska 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-Krzyszkowska 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)

Indywidualny wkład: autor korespondencyjny odpowiedzialny za aspekt molekularny badań; wiodący autor koncepcji pracy; pozyskanie dofinansowania na prowadzenie prac badawczych; zaplanowanie i przeprowadzenie wszystkich eksperymentów; uczestnictwo w wykonaniu prac związanych z zaprojektowaniem, optymalizacją i wdrożeniem autorskiego panelu do sekwencjonowania metodą NGS; interpretacja wyników; napisanie finalnej wersji manuskryptu. Mój udział w realizacji pracy – 70%.

Publikacja 2

Salacińska 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)

Indywidualny wkład: autor korespondencyjny odpowiedzialny za aspekt molekularny badań; wiodący autor koncepcji pracy; pozyskanie dofinansowania na prowadzenie prac badawczych; zaplanowanie i przeprowadzenie wszystkich eksperymentów; analiza danych; interpretacja wyników; napisanie finalnej wersji manuskryptu. Mój udział w realizacji pracy – 77%.

Publikacja 3

Salacińska 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)

Indywidualny wkład: autor korespondencyjny odpowiedzialny za aspekt molekularny badań; wiodący autor koncepcji pracy; pozyskanie dofinansowania na prowadzenie prac badawczych; zaplanowanie i przeprowadzenie wszystkich eksperymentów; napisanie finalnej wersji manuskryptu. Mój udział w realizacji pracy – 70%.

Łączna punktacja MNiSW cyklu publikacji: 270

Łączny Impact Factor cyklu publikacji: 11,972

3. Wstęp

3.1. Charakterystyka i opis kliniczny wrodzonej łamliwości kości

Wrodzona łamliwość kości (osteogenesis imperfecta, OI) jest dziedziczną chorobą tkanki łącznej. Szacuje się, że częstość występowania wynosi między 1 na 5000, a 1 na 20000 urodzeń, co kwalifikuje ją jako chorobę rzadką. Choroba cechuje się dużą heterogennością zarówno pod względem genetycznym, jak i fenotypowym. Niezależnie od przyczyny, wrodzona łamliwość kości związana jest z zaburzeniami cząsteczek kolagenu typu I, który występuje w wielu rodzajach tkanek (m.in. kościach, stawach, skórze właściwej, ścięgnach, tkance łącznej, twardówce, więzadłach, zębinie), co przekłada się na szerokie spektrum cech klinicznych obserwowanych u pacjentów (1-3).

Choroba charakteryzuje się niską masą kostną, prowadząc do licznych złamańiskoenergetycznych lub złamań w nietypowych miejscach, takich jak złamania kompresyjne kręgow. Łamliwość kości, powoduje znaczne ograniczenia z powodu bólu, czy bezruchu, często wykluczając pacjentów z normalnego funkcjonowania. Ponadto obserwuje się niedobory wzrostu, dysmorfie twarzoczaszki (makrocefalia, trójkątny kształt twarzy), łukowate wygięcia kości długich, deformacje klatki piersiowej oraz kręgosłupa. Wyniki badań radiologicznych wskazują na osteopenię bądź osteoporozę, a także obniżenie wysokości kręgow. Choroba obejmuje również cechy pozaszkieletowe, takie jak: niebieskie zabarwienie twardówek, utrata słuchu, zaburzenia rozwoju zębów (dentinogenesis imperfecta, DI), wiotkość stawów, zmniejszona pojemność płuc, czy niedomykalność zastawek serca. Histomorfometria bioptatu kości pacjentów wykazuje małą objętość kości i obniżone parametry materiałowe kości beleczkowej, przy jednoczesnym dużym obrocie kostnym (3, 4).

Chorobę cechuje nie tylko szerokie spektrum cech klinicznych, ale również zmienne nasilenie objawów - od postaci niemal bezobjawowej, aż po najcięższą powodującą śmierć w okresie okołoporodowym. Klasyfikacja kliniczna wrodzonej łamliwości kości została po raz pierwszy zaproponowana przez Sillence'a i współpracowników w 1979 roku. Dokonano wówczas podziału choroby na cztery typy:

- typ I - łagodna postać niedeformująca,
- typ II - letalny w okresie okołoporodowym,
- typ III - postać ciężka nieletalna, z postępującymi deformacjami,
- typ IV - o umiarkowanym nasileniu cech klinicznych (5).

Przez lata klasyfikacja ta przechodziła pewne modyfikacje, zarówno, jeśli chodzi o nazewnictwo, liczbę typów, czy sposób numeracji (początkowo były to cyfry rzymskie, obecnie cyfry arabskie). Jednakże podział ten zawsze odpowiadał nasileniu objawów, w oparciu o cechy kliniczne i radiograficzne, bez uwzględnienia podłoża genetycznego (1, 5, 6). Zgodnie z aktualną klasyfikacją wrodzona łamliwość kości została podzielona na pięć typów:

- typ 1 - niedeformujący (poprzednio typ I),
- typ 2 - letalny w okresie okołoporodowym (poprzednio typ II),
- typ 3 - postępująco-deformujący (poprzednio typ III),
- typ 4 - umiarkowany (poprzednio typ IV),
- typ 5 - ze zwapnieniami błon międzykostnych i/lub tworzeniem hiperplastycznych zgrubień (7).

W zależności od źródła, opis kliniczny poszczególnych typów może się nieco różnić. Wynika to zarówno z wielkości grupy badanej, wieku pacjentów, czy szczegółowości opisu. Poniżej przedstawiono dokładną charakterystykę pięciu typów klinicznych wrodzonej łamliwości kości.

Typ 1

Typ 1 wrodzonej łamliwości kości charakteryzuje się najłagodniejszymi objawami i przebiegiem. Pacjenci najczęściej rodzą się z prawidłową masą ciała i wzrostem. Pierwsze złamania pojawiają się w czasie pionizacji lub okresie przedszkolnym, rzadziej w okresie szkolnym lub podczas porodu. U większości chorych występują one z częstotliwością od kilku do kilkunastu rocznie, a ich liczba spada po okresie dojrzewania. Ponowny wzrost liczby złamań obserwuje się w wieku dorosłym, szczególnie w okresie pomenopauzalnym u kobiet oraz mężczyzn po piątej dekadzie życia. W sumie pacjenci mogą doświadczyć od kilku do nawet powyżej 100 złamań, jednakże zdarzają się osoby, które nie doznały żadnego złamania. U większości chorych nie obserwuje się niedoborów wzrostu, choć najczęściej są oni niżsi od pozostałych członków rodziny. W życiu dorosłym u 40% pacjentów wzrost mieści się między 3 a 50 centylem, a u prawie 50% wynosi poniżej 3 centyla. Deformacje kończyn górnych i dolnych dotyczą niewielkiego odsetka osób (10-18%), są to najczęściej lekkie wygięcia, głównie kości udowych i piszczeli. Bardzo rzadko obserwuje się je w okresie noworodkowym. Zaledwie 20% pacjentów cierpi na kifozę lub skoliozę, u części obserwuje się również wiotkość stawów. U 30% chorych występuje trójkątny kształt

twarzy, u 60% wady uzębienia (raczej w formie przebarwień i przetarć, niż klasycznej DI), a 75% ma skłonność do powstawania siniaków. Dla pacjentów z typem 1 charakterystyczne jest niebieskie zabarwienie twardówek. Wady słuchu odnotowuje się najczęściej w trzeciej dekadzie życia. U 35% chorych podejrzewa się lub stwierdza lekkie wady słuchu, natomiast 40% dorosłych występują poważne wady wymagające używania aparatu słuchowego lub kwalifikujące do operacji. Większość pacjentów porusza się samodzielnie i nie ma problemów w wykonywaniu codziennych czynności. U nielicznych pacjentów obserwowane są zaburzenia chodu, a ograniczenia mobilności związane są najczęściej z niedawno przeżytym urazem. W skrajnych przypadkach chorzy używają kul lub wózka inwalidzkiego. Z reguły pacjenci nie wymagają hospitalizacji, czy wsparcia aparatury podtrzymującej funkcje życiowe (1, 5).

Typ 2

Typ 2 jest najcięższą postacią wrodzonej łamliwości kości. W części przypadków dochodzi do samoistnych poronień, część ciężko kończy się martwym urodzeniem lub śmiercią dziecka w okresie okołoporodowym. Niezwykle rzadko dziecko dożywa roku, jednakże wymaga ono ciągłego wsparcia aparatury podtrzymującej funkcje życiowe. Do śmierci dochodzi najczęściej w wyniku niewydolności oddechowej związanej z małą klatką piersiową, złamaniami żeber lub przyjmowania niewystarczającej liczby kalorii. Nieprawidłowości wskazujące na postać letalną są widoczne już w okresie okołoporodowym. Większość dzieci rodzi się przed terminem, z obniżoną masą urodzeniową i długością ciała w stosunku do wieku. U wszystkich obserwuje się skrócenie i wygięcie kończyn dolnych i górnych. Biodra są zwykle zgięte i odwiedzione. Wyniki badania RTG u pacjentów z typem 2 wskazują na nieprawidłowości kości udowych, złamania i deformacje trzonów kości kończyn górnych oraz paciorkowaty kształt żeber. Badania histologiczne pokazują wyraźną redukcję kolagenu w beleczkach i kości korowej. W części korowej znajdują się duże osteocyty, a w części beleczkowej duże niedojrzałe osteoblasty. Dodatkowo u dzieci można stwierdzić słabe kostnienie kości czaszki oraz nieproporcjonalnie dużą głowę w stosunku do reszty ciała. U niemal wszystkich pacjentów występują niebieskie twardówki (1, 5).

Typ 3

Typ 3 jest najcięższą nieletalną formą wrodzonej łamliwości kości. Charakteryzuje się postępującym wraz z wiekiem nasileniem deformacji kostnych. Objawy choroby są najczęściej widoczne już w okresie noworodkowym, kiedy dochodzi również do pierwszych niskoenergetycznych złamań. W części pacjentów liczba i rozległość złamań żeber może doprowadzić do śmierci z powodu niewydolności oddechowej w pierwszych tygodniach lub miesiącach życia, w rzadkich przypadkach z powodu niewydolności serca lub płuc w dzieciństwie. U niemowląt obserwuje się powiększone ciemiączka, szerokie szwy czaszkowe oraz kości Wormiana. Pacjenci z typem 3 cierpią na poważne niedobory wzrostu. U około 95% wzrost wynosi poniżej 3 centyla. Część dorosłych osiąga nie więcej niż metr wysokości. Pierwsze złamania pojawiają się najczęściej w okresie okołoporodowym, rzadziej w momencie pionizacji lub okresie przedszkolnym. Chorzy doświadczają wielokrotnych złamań kości długich i żeber, u pojedynczego pacjenta może dojść nawet do 200 urazów. U części osób mimo braku złamań, dochodzi do nasilenia deformacji kostnych. Deformacje kończyn górnych i dolnych występują w ponad 80% chorych i nasilają się wraz z wiekiem. Około 65% pacjentów wymaga korekty osi kończyn za pomocą prętów. U 40% osób rozwija się kifoza, a u 60% skolioza. W przypadku dorosłych obserwuje się poważne deformacje kręgosłupa i klatki piersiowej. Niebieskie zabarwienie twardówek występuje u większości pacjentów już w okresie niemowlęcym, jednak cecha często zanika z wiekiem. Trójkątny kształt twarzy obserwuje się u 85% chorych, wiotkość stawów u 50%, a zaburzenia rozwoju zębów u 45%. Siniaczenie skóry oraz wady słuchu są rzadko obserwowane. Według danych literaturowych u kilku osób odnotowano krwotok śródmózgowy. Większość pacjentów wymaga pomocy podczas poruszania się ze względu na poważne deformacje kończyn i narażenie na złamania. Część osób używa chodzika, kul lub wózka inwalidzkiego. W skrajnych sytuacjach chorzy wymagają wsparcia podczas wykonywania codziennych czynności. Długość życia pacjentów z typem 3 może być skrócona w przypadku ciężkiej kifoskoliozy z towarzyszącą chorobą płuc, skutkującą niewydolnością serca (1, 5).

Typ 4

Typ 4 jest prawdopodobnie najtrudniejszym do scharakteryzowania typem wrodzonej łamliwości kości. Jest on formą mieszczącą się pomiędzy łagodnym typem 1, a postępująco-deformującym typem 3. Pacjenci prezentują znaczne zróżnicowanie

w występowaniu i nasileniu cech. Najczęściej obserwuje się niski wzrost, cechy osteoporozy oraz wady uzębienia, zarówno w postaci DI, jak też odbarwień, czy pęknięć szkliwa. Twardówki są zwykle jasnoniebieskie lub szare, lecz cecha ta szybko zanika z wiekiem. Wady słuchu są rzadko opisywane, podobnie jak trójkątny kształt twarzy. Liczba złamań oraz stopień deformacji kości jest bardzo zróżnicowany (1, 5).

Typ 5

Typ 5 charakteryzuje się zwapnieniami błon międzykostnych w przedramionach i kończynach dolnych oraz tworzeniem hiperplastycznych zgrubień po doznanych urazach. Zwapnienia obserwowane już w młodym wieku, znacznie ograniczają ruchomość stawów kończyn. Z kolei zgrubienia powodują u pacjentów swędzenie oraz ból. W badaniu histomorfometrycznym można dodatkowo zaobserwować lamelację przypominającą siatkę (ang. mesh-like lamellation). Typ 5 został po raz pierwszy opisany na początku XX wieku, jednak wyszczególniono go jako odrębny typ kliniczny dopiero w 2009 roku. W 2012 roku określono, że u podłoża genetycznego występowania tych specyficznych objawów leżą patogenne warianty w genie *IFITM5*. Ogólne nasilenie i spektrum cech klinicznych jest zbliżone do typu 3 i 4. U pacjentów nie występuje niebieskie zabarwienie twardówek, wady uzębienia, czy kości Wormiana (1, 6).

Oprócz wymienionych wcześniej cech klinicznych, niezależnie od typu choroby, u niewielkiego odsetka pacjentów występuje zapalenie stawów, bóle stawów i bóle mięśniowo-powięziowe. Opisano także zwiększone ryzyko chorób serca i naczyń, w tym rozwarstwienie tętnicy i aorty, oraz tętniaki aorty (1).

Zaproponowana klasyfikacja zapewnia informacje dotyczące prognozy i sposobu prowadzenia pacjenta, jednakże w przypadku każdego typu nasilenie i występowanie poszczególnych cech stanowi pewne kontinuum. Pozostawia to wrażenie, że granice między typami są płynne, co w praktyce przekłada się na różnice kliniczne obserwowane między rodzinami z tym samym typem choroby, a także między spokrewnionymi pacjentami mającymi ten sam wariant sprawczy (1).

Ponadto fenotyp jest wypadkową wszystkich cech występujących w danym momencie u chorego, zatem wpływ na ocenę kliniczną może mieć:

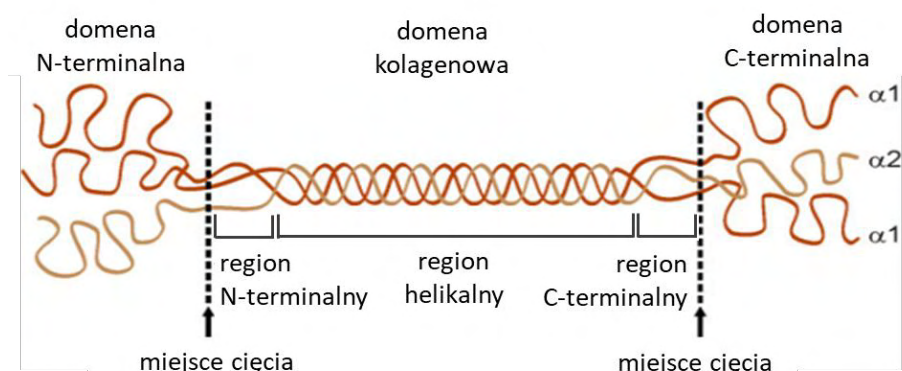
- wiek pacjenta w momencie badania (pojawianie się lub zanik pewnych cech z wiekiem np. tworzenie hiperplastycznych zgrubień, niebieskie twardówki, DI),
- zmienne nasilenie cech (np. deformacje kości),

- dostępność narzędzi diagnostycznych (np. densytometria, badania histologiczne) oraz możliwość ich zastosowania (trudności w wykonaniu badania u małych dzieci),
- moment rozpoczęcia odpowiedniej opieki nad pacjentem (ograniczenie liczby złamań),
- wdrożenie i skuteczność leczenia farmakologicznego (możliwe złagodzenie przebiegu choroby) (1, 4, 8, 9).

Ze względu na brak jednoznacznej skali oraz wpływ dodatkowych czynników, ocena kliniczna pacjentów z wrodzoną łamliwością kości jest obarczona pewną subiektywnością. Dlatego bardzo ważne jest doświadczenie lekarza oraz stosowanie jednolitego systemu klasyfikacji pacjentów w praktyce klinicznej (1, 4, 9).

3.2. Podłoże genetyczne

Najczęstszą przyczyną wrodzonej łamliwości kości są heterozygotyczne warianty zlokalizowane w genach *COL1A1* i *COL1A2*, które kodują białka kolagenu typu I. Każda cząsteczka składa się z 2 łańcuchów pro $\alpha 1(I)$ kodowanych przez gen *COL1A1* i 1 łańcucha pro $\alpha 2(I)$ kodowanego przez gen *COL1A2*. Połączone ze sobą tworzą tzw. potrójną helisę, w której można wyróżnić trzy domeny: N-terminalną, kolagenową oraz C-terminalną. Po odcięciu bocznych domen powstaje dojrzała cząsteczka kolagenu składająca się z regionu N- i C-terminalnego oraz regionu helikalnego, zbudowanego ze 1014 aminokwasów (Rycina 1). W obu łańcuchach aminokwasy tworzą 338 powtórzeń motywu Gly-X-Y, gdzie Gly to glicyna, a X i Y to najczęściej prolina i hydroksyprolina. Obecność glicyny w co trzeciej pozycji jest kluczowa dla utworzenia charakterystycznej struktury potrójnej helisy (10).



Rycina 1. Budowa cząsteczki kolagenu typu I. Na podstawie publikacji „Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease”, zmodyfikowano.

W zależności rodzaju wariantu, może dojść do zaburzeń ilościowych lub jakościowych cząsteczek kolagenu typu I. Zaburzenia ilościowe są spowodowane zainicjowaniem przedwczesnego kodonu terminacyjnego, co prowadzi do skrócenia i zmniejszenia stabilności cząsteczek mRNA. Niestabilne cząsteczki są usuwane w mechanizmie NMD (ang. nonsense-mediated decay). Zmniejszenie liczby cząsteczek kolagenu powoduje powstawanie mniejszej liczby fibryli kolagenowych. Zaburzenia jakościowe wynikają ze zmiany w strukturze łańcucha pro $\alpha 1(I)$ lub pro $\alpha 2(I)$, który zostaje wbudowany w strukturę potrójnej helisy, a następnie fibryli kolagenowych. Prowadzi to do naruszenia integralności strukturalnej macierzy kostnej, mimo zachowania prawidłowej liczby cząsteczek kolagenu (1, 3).

W przypadku genów *COL1A1* i *COL1A2* penetracja wynosi 100%. Na podstawie licznych badań określono, że występowanie tego samego wariantu u niespokrewnionych pacjentów z wrodzoną łamliwością kości jest niezwykle rzadkie. Z kolei obserwowane różnice fenotypowe u osób z tą samą mutacją sprawczą mogą być związane ze zmienną ekspresją (1, 4).

W mniejszym stopniu wystąpienie wrodzonej łamliwości kości jest spowodowane patogennymi wariantami zlokalizowanymi w tzw. „genach niekolagenowych”. Kodują one białka biorące udział m.in. w procesie:

- biosyntezy kolagenu,
- regulacji transkrypcji,
- modyfikacji kolagenu (tworzenie kompleksu enzymatycznego inicjującego łączenie i składanie kolagenu do struktury potrójnej helisy, usuwanie końców N- i C-terminalnych),
- transportu przez błony retikulum endoplazmatycznego i aparat Golgiego,
- fałdowania i sieciowania kolagenu (kontrola jakości),
- różnicowania i dojrzewania osteoblastów,
- mineralizacji kości (6).

W oparciu o podłoże genetyczne opisano dotąd XXII typy choroby, z czego typ I-IV związany jest z patogennymi wariantami w genach kodujących kolagen typu I. Choć kolejne typy wrodzonej łamliwości kości różnią się etiologią i sposobem dziedziczenia, klinicznie przypominają one typy 2-4 (Tabela 1) (7, 12).

Na podstawie rutynowych metod diagnostycznych (wywiad kliniczny, ocena fizykalna, zdjęcia radiologiczne) można prawidłowo rozpoznać jedynie typy I-V (6, 13).

Tabela 1. Podział wrodzonej łamliwości kości ze względu na podłoże genetyczne, z uwzględnieniem typu klinicznego i sposobu dziedziczenia. Na podstawie publikacji „Nosology of genetic skeletal disorders: 2023 revision”.

Typ OMIM	Gen	Typ kliniczny	Sposób dziedziczenia
I.	<i>COL1A1, COL1A2</i>	1	AD
II.	<i>COL1A1, COL1A2</i>	2	AD
III.	<i>COL1A1, COL1A2</i>	3	AD
IV.	<i>COL1A1, COL1A2</i>	4	AD
V.	<i>IFITM5</i>	3, 4, 5	AD
VI.	<i>SERPINF1</i>	3	AR
VII.	<i>CRTAP</i>	2, 3, 4	AR
VIII.	<i>P3H1</i>	2, 3	AR
IX.	<i>PPIB</i>	2, 3, 4	AR
X.	<i>SERPINH1</i>	3	AR
XI.	<i>FKBP10</i>	3, 4	AR
XII.	<i>SP7</i>	4	AR
XIII.	<i>BMP1</i>	3	AR
XIV.	<i>TMEM38B</i>	3	AR
XV.	<i>WNT1</i>	3, 4	AR
XVI.	<i>CREB3L1</i>	3	AR
XVII.	<i>SPARC</i>	3	AR
XVIII.	<i>TENT5A</i>	3	AR
XIX.	<i>MBTPS2</i>	3	XL
XX.	<i>MESD</i>	3	AR
XXI.	<i>KDEL2</i>	3	AR
XXII.	<i>CCDC134</i>	3	AR

Przypisy: AD – autosomalnie dominujące, AR – autosomalnie recesywne, XL – związane z chromosomem X.

3.3. Poszukiwanie korelacji genotypowo-fenotypowej

W wyniku wielu lat badań nad wrodzoną łamliwością kości zaobserwowano pewne zależności między występującym wariantem a obrazem klinicznym pacjenta. Wśród czynników wpływających na nasilenie objawów wymieniano:

- rodzaj wariantu i jego efekt na cząsteczki kolagenu,
- gen, w którym znajduje się wariant sprawczy,
- lokalizację w łańcuchu,
- aminokwas ulegający substytucji w miejsce glicyny (4, 14-17).

Początkowo uważano, że fenotyp pacjenta zależy od typu mutacji, a dokładnie jego wpływu na liczbę lub jakość cząsteczek kolagenu typu I. Zgodnie z tym założeniem, mutacje prowadzące do zmniejszenia liczby prawidłowych cząsteczek prokolagenu typu I z reguły skutkują łagodniejszym fenotypem. Należą do nich mutacje typu: nonsense

(zmiana aminokwasu na kodon terminacyjny), frameshift (zmiana ramki odczytu w wyniku delecji/duplikacji nukleotydu niebędącej liczbą 3 lub jej wielokrotnością), splicing (zmiana zlokalizowana w regionie niekodującym). Z kolei mutacje jakościowe prowadzą do cięższej postaci klinicznej (typ 2, 3, 4). Zaburzenie struktury łańcucha pro $\alpha 1(I)$ lub pro $\alpha 2(I)$ może być spowodowane mutacjami typu: missense (substytucja glicyny w domenie helikalnej łańcucha), splicing oraz in-frame (delecja/duplikacja trzech nukleotydów lub ich wielokrotności niezaburzająca ramki odczytu) (1, 6, 13).

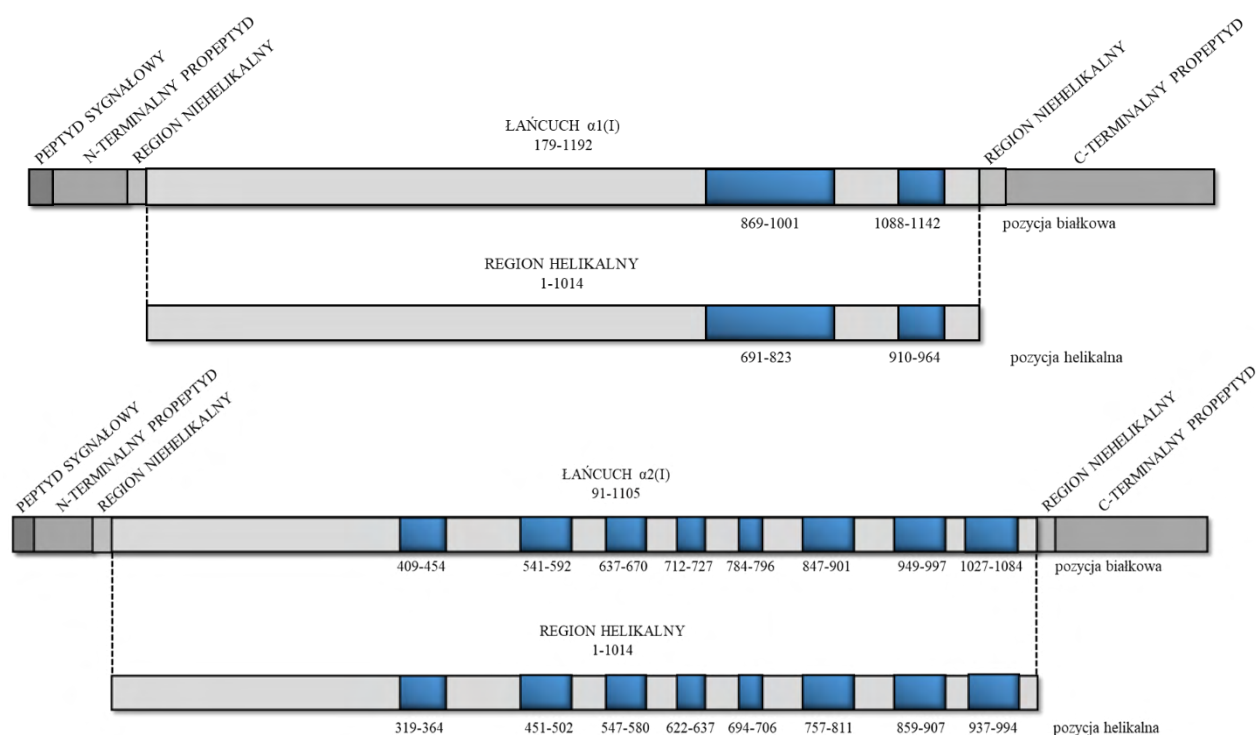
Za różnice obserwowane między pacjentami może odpowiadać także gen, w którym zlokalizowany jest wariant sprawczy. Warianty w genie *COL1A1* mogą być związane z cięższymi objawami, ponieważ powodują zaburzenia w trzech czwartych cząsteczek (połowa zawiera jeden nieprawidłowy łańcuch pro $\alpha 1(I)$, a jedna czwarta aż dwa nieprawidłowe łańcuchy). Z kolei warianty w genie *COL1A2* powodują zaburzenia w połowie powstałych cząsteczek kolagenu (14).

Kolejnym czynnikiem podejrzewanym o wpływ na nasilenie objawów jest lokalizacja substytucji glicyny tzw. model gradientowy. Warianty zlokalizowane bliżej końca N-terminalnego mogą powodować łagodniejszy fenotyp, ponieważ składanie łańcuchów rozpoczyna się od strony C-terminalnej (14, 16, 18).

Przypuszcza się również, że wpływ na fenotyp ma aminokwas ulegający substytucji w miejsce glicyny. Zgodnie ze strukturą potrójnej helisy, w co trzeciej pozycji znajduje się glicyna będąca najmniej rozgałęzionym aminokwasem. Substytucja w pierwszej pozycji kodonu dla glicyny powoduje powstanie: argininy, cysteiny, seryny, tryptofanu; w drugiej pozycji: alaniny, kwasu asparaginowego, kwasu glutaminowego, waliny. W zależności od aminokwasu obserwuje się różne nasilenie objawów, co sugeruje związek między jego konformacją przestrzenną, a zachowaniem struktury potrójnej helisy. Zakłada się, że może mieć to związek z podobieństwem glicyny do substytuującego aminokwasu – im mniejszy łańcuch boczny tym łagodniejszy fenotyp. Z drugiej strony im większy łańcuch boczny, tym większe zaburzenie struktury potrójnej helisy i cięższe objawy (4, 16-18). Zgodnie z tą obserwacją aminokwasy z elektrycznie naładowanym łańcuchem bocznym (arginina, kwas asparaginowy, kwas glutaminowy) oraz z rozgałęzionym hydrofobowym łańcuchem bocznym (walina) są związane z występowaniem ciężkiej postaci wrodzonej łamliwości kości. Z kolei aminokwasy z małym łańcuchem bocznym (alanina, cysteina, seryna) powodują łagodny fenotyp (17). Występowanie aminokwasów rozgałęzionych w części C-terminalnej i w dwóch trzecich domeny helikalnej genu *COL1A1* warunkuje prawie zawsze letalną

postać choroby, a w pozostałej części domeny nieletalny, ale wciąż ciężki fenotyp. W przypadku genu *COL1A2* zależności nie są tak wyraźne, przez co trudniej określić korelację genotypowo-fenotypową. Za potwierdzeniem tej teorii przemawia obserwacja, że substytucja glicyny w tym samym loci przez różne aminokwasy skutkuje występowaniem różnych typów wrodzonej łamliwości kości (18).

Na podstawie podobnych obserwacji zaproponowano tzw. model regionalny, zgodnie z którym w genie *COL1A1* i *COL1A2* znajdują się fragmenty związane z występowaniem substytucji glicyny powodujących niemal wyłącznie letalną formę choroby. Lokalizacja powyższych regionów odpowiada położeniu funkcjonalnych domen kluczowych dla utrzymania interakcji między kolagenem a cząsteczkami pozakomórkowymi. W genie *COL1A1* wyróżniono dwa tzw. „regiony letalne”, odpowiadające lokalizacji drugiego i trzeciego głównego regionu wiązania ligandów (ang. Major Ligand-Binding Region, MLBR). W genie *COL1A2* wyodrębniono osiem takich regionów odpowiadających miejscom odgrywającym ważną rolę w interakcji między fibrylami kolagenowymi a proteoglikanami (Rycina 2) (4, 17-18).



Rycina 2. Lokalizacja „regionów letalnych” w genach kolagenu typu I. Niebieskie segmenty reprezentują poszczególne „regiony letalne”. Numeracja regionów odpowiada pozycji białkowej i helikalnej w łańcuchu $\alpha 1(I)$ i $\alpha 2(I)$. Na podstawie publikacji „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”, zmodyfikowano.

Mimo wielu lat obserwacji wciąż nie udało się określić dokładnej korelacji między genotypem a fenotypem pacjentów z wrodzoną łamliwością kości. Jak dotąd największą trudność sprawiają warianty powodujące substytucję glicyny. Ograniczona skuteczność proponowanych modeli predykcyjnych wskazuje na złożoność patomechanizmu choroby. Być może przyczyną jest niewystarczająca liczba znanych wariantów oraz niezbadany dotąd udział czynników modyfikujących (2, 18).

Choć nadal trudno jest przewidzieć fenotyp związany z wykrytym wariantem, na podstawie znanych obserwacji oraz opisanych wcześniej przypadków można dokonać pewnej prognozy co do dalszych rokowań i przebiegu choroby. Stąd, tak ważne jest raportowanie wykrytych zmian do ogólnodostępnych baz danych, szczególnie w przypadku chorób rzadkich. Poszerzając wiedzę o spektrum wariantów związanych z wrodzoną łamliwością kości, znacząco zbliżamy się do poznania mechanizmu i korelacji genotypowo-fenotypowej tej heterogennej choroby.

3.4. Diagnostyka molekularna choroby

Diagnostyka molekularna odgrywa bardzo istotną rolę zarówno dla postawienia prawidłowej diagnozy, jak i poradnictwa genetycznego. Może dostarczyć informacji o przebiegu choroby, pomóc w ustaleniu planu opieki medycznej, określić szanse wystąpienia choroby u potomstwa pacjenta, ustalić status nosicielstwa wśród członków rodziny oraz wpłynąć na dobór odpowiedniego leczenia farmakologicznego (3).

Zgodnie ze światowymi zaleceniami, diagnostyka wrodzonej łamliwości kości powinna obejmować analizę sekwencji oraz analizę liczby kopii genów o potwierdzonym związku z występowaniem choroby. W sytuacji kiedy fenotyp pacjenta, historia rodzinna oraz badania biochemiczne sugerują wrodzoną łamliwość kości, zalecany jest następujący algorytm diagnostyczny:

1. Analiza sekwencji genów *COL1A1* oraz *COL1A2*

Badania populacyjne wskazują, że u 85-95% pacjentów wariant sprawczy występuje w jednym z dwóch genów kodujących cząsteczki kolagenu typu I. Ponadto dominujący odsetek to niewielkie delecje i duplikacje oraz mutacje punktowe (>95%), występujące na całej długości genów. Jak dotąd nie zaobserwowano wariantów powtarzających się w dużej grupie pacjentów lub charakterystycznych dla danej populacji (tzw. miejsca hot-spot). Sekwencjonowanie powinno zatem obejmować wszystkie regiony kodujące

(eksony) oraz przylegające regiony niekodujące (na granicy intron-ekson). Analizę sekwencji można wykonać za pomocą tradycyjnego sekwencjonowania metodą Sanger'a oraz bardziej nowoczesną metodą sekwencjonowania następnej generacji (ang. Next Generation Sequencing, NGS). Identyfikacja patogennego lub prawdopodobnie patogennego wariantu w jednym allelu genu *COL1A1* lub *COL1A2* jest wystarczająca do postawienia rozpoznania molekularnego choroby oraz zakończenia diagnostyki u pacjenta.

2. Analiza liczby kopii (ang. copy number variation, CNV) genów *COL1A1* i *COL1A2*

Jak wskazują wyniki badań, u około 1-2% pacjentów przyczyną choroby są delecje lub duplikacje w genach *COL1A1* i *COL1A2*. Pierwotnie metodą uzupełniającą algorytm diagnostyczny była technika MLPA (ang. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) będąca odmianą reakcji łańcuchowej polimerazy, pozwalająca na ocenę liczby kopii badanego genu. Choć początkowo metoda sekwencjonowania NGS nie umożliwiała wykrycia rozległych delecji i duplikacji (np. obejmujących ekson lub cały gen), obecnie analiza CNV staje się rutynowym elementem tego badania. Identyfikacja delecji lub duplikacji jednego eksonu, kilku eksonów lub całego genu jest wystarczająca do postawienia rozpoznania molekularnego choroby oraz zakończenia diagnostyki u pacjenta.

3. Analiza sekwencji znanych „genów niekolagenowych”

U około 5-15% pacjentów za wystąpienie objawów choroby odpowiadają geny zaangażowane w liczne procesy związane m.in. z modyfikacjami cząsteczek kolagenu, dojrzewaniem osteoblastów czy mineralizacją kości. Charakteryzują się różnym sposobem dziedziczenia, dlatego dla części genów do postawienia rozpoznania molekularnego choroby oraz zakończenia diagnostyki u pacjenta konieczna będzie identyfikacja jednego lub dwóch patogennych wariantów. W przypadku dziedziczenia autosomalnie recesywnego, identyfikacja jednego wariantu o charakterze patogennym lub prawdopodobnie patogennym, wymaga uzupełnienia diagnostyki o analizę liczby kopii danego genu metodą MLPA (1, 19) (Rycina 3).



Rycina 3. Uproszczony schemat algorytmu diagnostycznego. Na podstawie „EMQN best practice guidelines for the laboratory diagnosis of osteogenesis imperfecta”, zmodyfikowano.

Obecnie najbardziej optymalną metodą diagnostyczną wrodzonej łamliwości kości wydaje się być technika wysokoprzepustowego sekwencjonowania następnej generacji (NGS). W porównaniu do poprzednio stosowanej metody sekwencjonowania metodą Sanger, NGS umożliwia jednoczasową analizę wielu genów w dużej grupie pacjentów, przy jednoczesnym obniżeniu kosztów oraz skróceniu czasu pracy. Porównanie obu metod przedstawiono w tabeli 2. W przypadku paneli projektowanych na zamówienie (ang. custom gene panel), możliwe jest stworzenie panelu zawierającego wszystkie geny o potwierdzonym udziale w patogenezie wrodzonej łamliwości kości. Ponadto odpowiednia obróbka danych NGS i zastosowanie dedykowanych narzędzi diagnostycznych umożliwia analizę rozległych delecji i duplikacji. W praktyce umożliwia to wykonanie pełnej diagnostyki pacjenta w ramach jednej procedury. Mimo wielu zalet technologii NGS, w praktyce laboratoryjnej nadal stosuje się metodę sekwencjonowania Sanger oraz metodę MLPA do weryfikacji uzyskanych wyników. Stosowanie tradycyjnych metod może także wynikać z wysokich kosztów zakupu platform do sekwencjonowania NGS (1, 19).

Tabela 2. Porównanie metody sekwencjonowania metodą Sangera i metody sekwencjonowania następnej generacji NGS.

Cecha	Metoda sekwencjonowania Sangera	Metoda sekwencjonowania następnej generacji NGS*
Zakres badania	1 ampikon	12-12 288 ampikonów**
Liczba badanych pacjentów	1	16-96
Czas trwania	2 dni	5 dni
Ilość materiału	1 µl DNA	10 µl DNA
Wykrywane warianty	Niewielkie delecje i duplikacje, mutacje punktowe	Niewielkie delecje i duplikacje, mutacje punktowe, rozległe delecje i duplikacje***
Ograniczenia metody	Rozległe delecje i duplikacje	Rozległe delecje i duplikacje***
Koszt	Ok. 350 zł	Ok. 1800 zł

*Dane dla technologii TruSeq CustomAmplicon (Illumina, USA). **1 ampikon odpowiada długości sekwencji do ok. 600 par zasad. Dla porównania do analizy sekwencji kodujących genu *COL1A1* potrzebnych jest ok. 35 ampikonów, a panel wszystkich znanych genów związanych z patologią wrodzonej łamliwości kości to ok. 500 ampikonów. ***W zależności od sposobu obróbki i dostępnych narzędzi bioinformatycznych, na bazie danych NGS możliwa jest analiza rozległych delecji i duplikacji.

Zaproponowany w 2012 roku algorytm diagnostyczny wyczerpuje powszechnie dostępne narzędzia diagnostyczne w zakresie znanych przyczyn genetycznych wrodzonej łamliwości kości. Jeżeli wykonanie wszystkich etapów nie umożliwiło identyfikacji wariantu/wariantów sprawczych, należy zakończyć proces diagnostyczny. W raporcie końcowym należy zaznaczyć, iż nie jest możliwe potwierdzenie klinicznego rozpoznania wrodzonej łamliwości kości (1, 19).

Opierając się o dane literaturowe, powyższy algorytm sugeruje przede wszystkim analizę sekwencji kodujących oraz przylegających sekwencji intronowych. Jednakże, nie można wykluczyć, że u części pacjentów wariant sprawczy może znajdować się w niebadanym regionie analizowanych genów np. regionie głęboko intronowym, czy regionie promotorowym. Ponadto ze względu na wysoce heterogenne podłoże genetyczne wrodzonej łamliwości kości, u pewnego odsetka pacjentów przyczyna może być związana z genem dotychczas niepodejrzewanym o udział w patogenezie choroby. Wykorzystując obecnie dostępne narzędzia molekularne, możliwe jest rozszerzenie poszukiwań przyczyny choroby o metodę sekwencjonowania całoksomowego (ang. Whole Exome Sequencing, WES) i całogenomowego (ang. Whole Genome Sequencing, WGS). Obie metody opierają się o technikę wysokoprzepustowego sekwencjonowania następnej generacji (NGS), jednakże różnią się zakresem analizy. Metoda WES umożliwia analizę wszystkich sekwencji kodujących oraz przylegających regionów niekodujących znanych genów człowieka. Z kolei metoda WGS obejmuje zarówno wszystkie sekwencje kodujące, jak i sekwencje niekodujące genomu.

Ze względu na malejące koszty badania całokosmowego, prawdopodobnie w najbliższym czasie zastąpi ono panelowy NGS. Dodatkową korzyścią metody WES jest możliwość reanalizy danych pod kątem poszukiwania patogennych wariantów w „nowych” genach istotnych w patogenezie choroby. Biorąc pod uwagę trudność w interpretacji danych otrzymanych z sekwencjonowania całogenomowego oraz stosunkowo wysoki koszt badania, metoda WGS jest traktowana jako narzędzie naukowe, a nie diagnostyczne (20, 21).

Oprócz trudności diagnostycznych związanych ze zróżnicowanym fenotypem w obrębie wrodzonej łamliwości kości należy pamiętać, że istnieje wiele chorób, które prezentują zbliżone cechy kliniczne. Są to m.in. choroby charakteryzujące się obniżoną gęstością kości: osteoporoza pierwotna (MIM 166710, 300910, 301014, 615220), zespół Bruck’a (MIM 259450, MIM 609220), zespół Cole-Carpenter’a (MIM 112240, MIM 616294), ale również hipofosfatazja (MIM 146300), Osteoporosis Pseudoglioma Syndrome (MIM 259770), zespół Hajdu-Cheney (MIM 102500), geroderma osteodysplastica (MIM 231070), gnathodiaphyseal dysplasia (MIM 166260) i Dentinogenesis imperfecta (MIM 125490) (1, 4, 6, 7). Na etapie prenatalnym, na podstawie badań ultrasonograficznych, wrodzona łamliwość kości może być także mylona z ciężką postacią hipofosfatazji (MIM 214500), dysplazją tanatoforyczną (MIM 187600, 187601), achondrogezą typu 1B (MIM 600972), czy dysplazją kampomieliiczną (MIM 114290) (4, 12, 22). Pomijając różnice w podłożu genetycznym i sposobie dziedziczenia, każda z chorób cechuje się innym przebiegiem oraz zaleceniami dotyczącymi leczenia. W przypadku niejasnego fenotypu pacjenta zaleca się wykonanie badania metodą WES (19).

3.5. Leczenie

Wrodzona łamliwość kości jest chorobą nieuleczalną, która w zależności od nasilenia objawów, stopnia niepełnosprawności oraz wieku wymaga indywidualnego podejścia terapeutycznego. Opieka medyczna skupia się przede wszystkim na minimalizacji liczby złamań, poprawie samodzielności i jakości życia pacjentów. Pacjent może wymagać wielospecjalistycznej opieki pediatrycznej, ortopedycznej, okulistycznej, genetycznej, stomatologicznej, rehabilitacyjnej, kardiologicznej i psychologicznej, a w cięższych przypadkach licznych operacji chirurgicznych, czy podtrzymywania funkcji życiowych przez aparaturę tlenową. W leczeniu wrodzonej

łamliwości kości najczęściej stosuje się preparaty z witaminą D i wapniem, w cięższych przypadkach włączane jest cykliczne leczenie farmakologiczne (1, 4, 13, 23). Mimo stosowanych terapii, choroba pozostaje obciążeniem, które ogranicza człowieka w codziennych czynnościach i znacząco obniża jakość życia. Wciąż brak jest dedykowanego leku zarejestrowanego do terapii w tej grupie chorych.

Od prawie 30 lat leczenie wrodzonej łamliwości kości oparte jest na bisfosfonianach - lekach antyresorpcyjnych zarejestrowanych dla pierwotnej i wtórnej osteoporozy. Do najczęściej stosowanych środków należą pamidronian i kwas zoledronowy (24). Leki te używane u pacjentów z wrodzoną łamliwością kości skutkują zwiększeniem gęstości mineralnej, co można tłumaczyć ich działaniem na osteoklasty i hamowaniem resorpcji kości. Zgodnie z najnowszymi rekomendacjami, dożylne podanie bisfosfonianów zaleca się u dzieci i dorosłych z ciężką postacią choroby (typ 3) oraz u dzieci ze złamaniami kręgów lub w przypadku występowania dwóch lub więcej złamań kości długich rocznie. Doustne podanie leku zaleca się u pacjentów z łagodną oraz umiarkowaną postacią choroby (typ 1, 4) przy jednoczesnym braku złamań kręgów. Efekt terapii bisfosfonianami na redukcję złamań i poprawę jakości życia chorych jest określany jako niepewny (25). Ponadto u pacjentów zaobserwowano pewne efekty uboczne w postaci: gorączki, biegunki, hipokalcemii, hipofosfatemii oraz zaburzeń ze strony układu pokarmowego. Mimo relatywnie długiego okresu półtrwania, największą skuteczność wykazują w pierwszym roku podaży. Niestety u części pacjentów (z umiarkowaną ciężką formą wrodzonej łamliwości kości, u których nie potwierdzono obecności mutacji w genach *COL1A1* i *COL1A2*), wykazano bardzo słabą odpowiedź na leczenie bisfosfonianami (26).

Do grupy leków antyresorpcyjnych należy również denosumab - ludzkie przeciwciało monoklonalne (IgG₂) skierowane przeciwko ligandom aktywatora receptora jądrowego czynnik kappa-B (RANKL) (26). Jego działanie opiera się na blokowaniu interakcji ligandów RANKL z receptorami RANK, co prowadzi do zahamowania aktywności istniejących osteoklastów oraz powstawania nowych. Z tego powodu najlepsze efekty powinien wykazywać wśród pacjentów z patogennymi wariantami w genie *SERPINF1* (wrodzona łamliwość kości typu VI), skutkującymi zwiększoną aktywnością osteoklastów. Denosumab, zarejestrowany do leczenia osteoporozy postmenopauzalnej, wykazuje znaczący wzrost gęstości mineralnej kości oraz spadek częstości występowania złamań (24). Wśród skutków ubocznych stosowania leku wymienia się: nasilenie objawów po odstawieniu leku, hiperkalcemię oraz hiperkalciurię

(26). Badania kliniczne z zastosowaniem denosumabu u dzieci z wrodzoną łamliwością kości były prowadzone w latach 2015-2022, w tym również w Polsce. Jednakże ze względów bezpieczeństwa badanie zostało przerwane przez sponsora z powodu hiperkalcemii u uczestników badania (27).

Wśród proponowanych terapii znalazł się również hormon wzrostu, którego pozytywny wpływ na zwiększenie wytrzymałości kości zaobserwowano u dzieci z deficytem tego hormonu. Badania z użyciem teryparatydu (syntetycznego hormonu przytarczyc) do leczenia osteoporozy postmenopauzalnej wykazały wzrost gęstości masy kostnej u chorych. Choć podobne efekty działania leku zaobserwowano w grupie dorosłych pacjentów z wrodzoną łamliwością kości, nie podjęto takich badań na dzieciach ze względu na zwiększone ryzyko wystąpienia kostniakomięsaków raportowanych w badaniach na zwierzętach (26).

Kolejna klasa leków stosowanych w terapii wrodzonej łamliwości kości opiera się na stymulowaniu kościotworzenia. Jednym z takich preparatów jest romosozumab - humanizowane przeciwciało monoklonalne skierowane przeciw sklerostynie. W wyniku hamowania jej aktywność, wspomaga w ten sposób proces tworzenia osteoidu poprzez aktywację osteoklastów i rekrutowanie komórek osteoprogenitorowych. Ponadto, romosozumab modyfikuje ekspresję mediatorów aktywacji osteoklastów, co powoduje także zmniejszenie resorpcji tkanki kostnej. Rezultatem tego podwójnego efektu (aktywacja procesu kościotworzenia i zmniejszania resorpcji kości) jest obserwowany istotny wzrost masy kostnej, a co za tym idzie poprawa w zakresie struktury i jakości kości. Obecnie lek ten jest zarejestrowany do leczenia osteoporozy u kobiet w okresie pomenopauzalnym. Do preparatów z grupy przeciwciał anty-sklerostynie zalicza się również blosozumab oraz przeciwciało BPS804. Liczne badania dowodzą ich korzystny wpływ na poprawę gęstości kości i zmniejszenie liczby złamań u pacjentów z osteoporozą. Randomizowane badanie kliniczne fazy IIa w grupie pacjentów z typem 4 wrodzonej łamliwości kości, dowiodło że dożylna podaż przeciwciała BPS804 znacząco zwiększyła liczbę markerów kościotworzenia, obniżyła ilość markerów resorpcyjnych i poprawiła gęstość kości w odcinku lędźwiowym (24). Wyniki badań u osób z pierwotną osteoporozą oraz pacjentek w okresie postmenopauzalnym, wykazują zwiększone występowanie zdarzeń niepożądanych ze strony układu sercowo-naczyniowego w grupie leczonej romosozumabem (w tym zawał mięśnia sercowego, udar, niewydolność serca i zgon) (26). Obecnie prowadzone są dwa badania z zastosowaniem preparatu setrusumab (przeciwciało BPS804)

u pacjentów z wrodzoną łamliwością kości, pierwsze – otwarte, randomizowane badanie fazy 3 porównujące działanie setrusumabu z bisfosfonianami (An Open-label, Randomized, Active-Controlled, Phase 3 Study of Setrusumab Compared With Bisphosphonates in Pediatric Subjects With Osteogenesis Imperfecta Types I, III or IV), oraz drugie – randomizowane badanie fazy 2/3 mające na celu ustalenie dawki, skuteczności oraz bezpieczeństwa stosowania setrusumabu (An Operationally Seamless, Randomized Phase 2/3 Study Consisting of a Phase 2 Single-Blind, Dose-Evaluation Phase and a Phase 3 Double-Blind, Placebo-Controlled Phase to Assess the Efficacy and Safety of Setrusumab in Subjects With Osteogenesis Imperfecta). W Polsce rozpoczyna się także badanie kliniczne pt. „Wieloośrodkowe, randomizowane badanie kliniczne fazy 3, prowadzone metodą otwartej próby, mające na celu ocenę skuteczności i bezpieczeństwa terapii romosozumabem w porównaniu do terapii bisfosfonianami u dzieci i młodzieży z wrodzoną łamliwością kości” (27).

Kilka obiecujących metod leczenia wrodzonej łamliwości kości znajduje się obecnie w fazie eksperymentalnej. Jedną z nich jest zastosowanie przeciwciał przeciwko transformującemu czynnikowi wzrostu β (tzw. anty-TGF- β), który odgrywa kluczową rolę w przebudowie kości poprzez sprzęganie procesu resorpcji kości i kościotworzenia. Zahamowanie działania czynnika TGF- β może doprowadzić do przyrostu masy kostnej, wpływając tym samym na wzrost wytrzymałości kości oraz zmniejszenie liczby złamań (26). Badania z zastosowaniem przeciwciał TGF- β wykazały wzrost masy kostnej na poszczególnych modelach mysich (tj. dla wrodzonej łamliwości kości związanych z mutacjami w genie *COL1A2* i *CRTAP*, cechujących się zwiększoną aktywnością czynnika TGF- β). Powyższe dane wskazują, że sygnalizacja TGF- β może być jednym z mechanizmów leżących u podłoża choroby, a tym samym może stanowić nowy cel leczenia. Niemniej jednak wydaje się, że skuteczność przeciwciał anty-TGF- β może różnić się w zależności od podłoża genetycznego choroby. Bezpieczeństwo stosowania fresolimumabu (przeciwciała anty-TGF- β), jest obecnie testowane w grupie pacjentów z typem 3 i 4 (z substytucją glicyny w genie *COL1A1* lub *COL1A2* oraz z patogennymi wariantami w genach *CRTAP*, *PPIB* oraz *P3H1*) (24). Preparat ten był dotychczas używany w leczeniu nowotworów (26).

Kolejna proponowana terapia opiera się o przeszczep mezenchymalnych komórek macierzystych, ze względu na ich zdolność do różnicowania w różne typy komórek. Dotychczasowe badania przeprowadzone u pacjentów z ciężką postacią wrodzonej łamliwości kości wykazały poprawę wzrostu kości, zwiększenie zawartości mineralnej

oraz spadek liczby złamań. Skuteczność przeszczepu ludzkich płodowych mezenchymalnych komórek macierzystych wykazano u pacjentów pediatrycznych, zarówno na etapie prenatalnym jak i postnatalnym. Mimo obiecujących efektów, szczególnie możliwości formowania prawidłowej budowy kości u najmłodszych pacjentów, terapia wymaga przeprowadzenia badań na większej grupie pacjentów (26).

Szeroką grupę stanowią również terapie wykorzystujące metody inżynierii genetycznej, oparte na przeprogramowaniu komórek somatycznych w indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste oraz skierowane na przeciwdziałanie stresowi komórkowemu (ang. ER stress). Dotychczas potencjalne korzyści z ich zastosowania obserwowano głównie na modelach komórkowych lub zwierzęcych. Możliwość wprowadzenia ich do leczenia pacjentów z wrodzoną łamliwością kości wymaga zwiększenia liczby badań z udziałem ludzi oraz wyeliminowania potencjalnych skutków ubocznych (23, 26).

4. Cele pracy

Sformułowano następujące cele badawcze:

1. Określenie podłoża genetycznego w grupie polskich pacjentów z wrodzoną łamliwością kości.
2. Poszukiwanie zmienności genetycznej w genach kolagenu typu I.
3. Ustalenie związku genotypu z obserwowanym efektem fenotypowym u pacjentów z potwierdzeniem molekularnym choroby.
4. Ocena skuteczności metody sekwencjonowania następnej generacji w diagnostyce wrodzonej łamliwości kości.

5. Materiał i metody

Przedłożony cykl publikacji jest efektem prowadzonego w latach 2016-2021 grantu młodego naukowca pt. "Genetyczne uwarunkowania wrodzonej łamliwości kości" finansowanego ze środków Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki nr 2016/IV/57-MN (kierownik projektu: mgr Kinga Sałacińska) oraz częściowo finansowany z grantu OPUS 2014/13/B/NZ5/03102 ze środków NCN (kierownik projektu: dr hab. n. med. Agnieszka Gach, prof. instytutu).

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

5.1. Grupa badana

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

- Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi, Poradnia Genetyczna, Łódź,
- Centralny Szpital Kliniczny im. M. Konopnickiej w Łodzi, Klinika Propedeutyki Pediatrii i Chorób Metabolicznych Kości, Łódź,
- Górnośląskie Centrum Zdrowia Dziecka im. Św. Jana Pawła II, Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny nr 6 Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, Oddział Pediatrii i Endokrynologii Dziecięcej z Pododdziałem Zaburzeń Rozwoju Płci, Katowice,
- Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie, Klinika Pediatrii, Endokrynologii, Diabetologii, Chorób Metabolicznych i Kardiologii Wieku Rozwojowego, Szczecin,
- Szpital Uniwersytecki w Krakowie, Oddział Kliniczny Położnictwa i Perinatologii, Kraków
- Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, Katedra i Zakład Genetyki Medycznej, Poznań.

Badaniem objęto materiał pochodzący od dwóch płodów oraz 137 pacjentów pediatrycznych i 50 dorosłych, w wieku od 3 miesięcy do 46 lat. Pacjenci pochodzenia kaukaskiego prezentowali zróżnicowane nasilenie cech klinicznych. Do oceny fenotypowej zastosowano klasyfikację Sillence'a. Dane kliniczne pochodziły z kart medycznych pacjentów oraz z ankiet przygotowanych na potrzeby projektu.

Materiał genetyczny w postaci genomowego DNA posłużył do wykonania badania metodą NGS u wszystkich 197 pacjentów. Po przeprowadzeniu analizy bioinformatycznej uzyskanych danych oraz klasyfikacji wariantów, wytypowano zmiany mogące mieć związek z wystąpieniem objawów choroby. Obecność powyższych wariantów potwierdzono metodą sekwencjonowania Sangera. Pacjenci, u których nie wykryto wariantów sprawczych, mieli dodatkowo wykonane badanie metodą MLPA w celu identyfikacji delecji lub duplikacji w obrębie genów kolagenu typu 1.

5.2. Izolacja materiału genetycznego

Materiał wyjściowy do wykonania wszystkich badań molekularnych stanowił genomowy DNA. W przypadku pacjentów postnatalnych, izolacji dokonano z krwi obwodowej pobranej do próbek z antykoagulantem EDTA, o objętości minimum 0,5mL. Genomowe DNA zostało automatycznie wyizolowane z wykorzystaniem komercyjnie dostępnego zestawu MagCore Genomic DNA Whole Blood Kit (RBC Bioscience, Taiwan). Do izolacji DNA pacjentów prenatalnych wykorzystano płyn owodniowy lub fragment sznura pępowinowego. Ekstrakcji dokonano przy użyciu manualnego zestawu Sherlock AX kit (A&A Biotechnology, Polska).

5.3. Sekwencjonowanie następnej generacji

Do określenia podłoża genetycznego wrodzonej łamliwości kości w badanej grupie pacjentów zastosowano metodę sekwencjonowania następnej generacji (NGS). W tym celu, korzystając z programu Illumina Design Studio, zaprojektowano autorski panel genów, w odniesieniu do sekwencji referencyjnej genomu ludzkiego GenBank GRCh37. Lista genów powstała na podstawie danych pochodzących z bazy OMIM (ang. Online Mendelian Inheritance in Man) oraz danych literaturowych. Ze względu na zmiany technologiczne wprowadzone przez producenta, w badaniu zastosowano dwa różne panele, oba umożliwiające analizę genów *COL1A1* i *COL1A2* w takim samym zakresie. Pierwszy panel, oparty o technologię TruSeq Custom Amplicon (Illumina, USA), obejmował geny o potwierdzonym (typ I-XVII) i prawdopodobnym udziale w patogenezie wrodzonej łamliwości kości oraz geny związane z chorobami o zbliżonym fenotypie (*COL1A1*, *COL1A2*, *IFITM5*, *SERPINF1*, *CRTAP*, *P3H1*, *PPIB*, *SERPINH1*, *FKBP10*, *SP7*, *BMP1*, *TMEM38B*, *WNT1*, *CREB3L1*, *SPARC*, *PLS3*, *SEC24D*, *P4HB*, *PLOD2*, *TNFSF11*, *LRP5*, *DKK1*, *RANKL*, *XYLT2*, *BMP2*, *BMP3*, *BMP4*, *BMP5*, *BMP6*,

BMP7, OPG, SOST, IL6, IGF1). Z jego użyciem wykonano badanie u 166 pacjentów. Drugi panel, oparty o technologię AmpliSeq DNA On-Demand (Illumina, USA), został nieco zmodyfikowany oraz zaktualizowany. Lista obejmowała geny związane z typami I-XIX wrodzonej łamliwości kości oraz geny związane z chorobami o zbliżonym fenotypie (*COL1A1, COL1A2, IFITM5, SERPINF1, CRTAP, P3H1, PPIB, SERPINH1, FKBP10, SP7, BMP1, TMEM38B, WNT1, CREB3L1, SPARC, TENT5A, MBTPS2, MESD, KDELR2, SEC24D, P4HB, PLOD2, PLS3, LRP5*). Z jego użyciem wykonano badanie u 31 pacjentów. W obu przypadkach zakres sekwencjonowania obejmował regiony kodujące oraz przylegające sekwencje intronowe.

Przed przystąpieniem do procedury sekwencjonowania, przeprowadzono wstępną ocenę jakości i stężenia wyizolowanego DNA metodą spektrofotometryczną przy użyciu aparatu NanoDrop (Thermo Scientific, USA). Pomiar stężenia DNA wykonano również drugą, bardziej czułą metodą fluorymetryczną przy użyciu urządzenia Quantus (Promega, USA) stosując komercyjnie dostępny zestaw QuantiFluor dsDNA ONE (Promega, USA). Próbkę pacjentów zostały przygotowane w sposób manualny, zgodnie z protokołem producenta. Procedura składała się z dziewięciu etapów:

1. Pomiar i rozcieńczenie DNA
2. Amplifikacja
3. Częściowe trawienie amplikonów
4. Ligacja indeksów
5. Pierwsze oczyszczanie biblioteki
6. Amplifikacja biblioteki
7. Drugie oczyszczanie biblioteki
8. Kontrola jakości bibliotek
9. Rozcieńczanie bibliotek

Etap kontroli jakości bibliotek wykonano przy użyciu komercyjnie dostępnych odczynników High Sensitivity D1000 ScreenTape (Agilent, USA). Pomiaru stężenia i wielkości bibliotek dokonano na aparacie TapeStation 4150 (Agilent, USA).

Jednorazowo procedurę prowadzono dla grupy od 16 do 48 próbek. Efektem końcowym było połączenie rozcieńczonych bibliotek oraz ich denaturacja. Sekwencjonowanie przeprowadzono na platformie MiniSeq (Illumina, USA) z użyciem dwóch typów kartridży (Mid Output i High Output Kit, 300 cycles; Illumina, USA).

5.4. Analiza bioinformatyczna, filtrowanie i klasyfikacja wariantów

Dane uzyskane w wyniku sekwencjonowania zostały poddane pierwszorzędowej analizie z użyciem wewnętrznego oprogramowania urządzenia MiniSeq oraz aplikacji Local Run Manager (uszeregowanie odczytów, mapowanie, ocena jakości, przekonwertowanie plików do formatu .bam i .vcf).

Analizę wykrytych wariantów przeprowadzono z pomocą programu Variant Studio (Illumina, USA) przyrównując je do sekwencji referencyjnej genomu ludzkiego GenBank GRCh37. Do wizualizacji odczytów zastosowano program IGV (ang. Integrative Genomics Viewer, <https://igv.org/>) Filtrowanie przeprowadzono na podstawie przygotowanego algorytmu postępowania, gdzie oceniano warianty pod względem:

- wpływu na strukturę i funkcję genu/białka (analiza wariantów typu missense, nonsense, frameshift, splicing),
- częstości występowania w populacji (częstość <2% dla populacji europejskiej nie-fińskiej, bazy: gnomAD Exomes, gnomAD Genomes),
- informacji zawartych w bazach danych wariantów (dbSNP, ClinVar, HGMD, LOVD),
- przewidywanego efektu na podstawie algorytmów *in-silico* (m.in. MutationTaster, Revel, SIFT, PolyPhen, FATHMM, DANN, SpliceAI),
- informacji zawartych w dostępnej literaturze.

Nieopisane w bazach danych warianty oceniano dodatkowo pod kątem stopnia konserwacji ewolucyjnej, stosując narzędzie do porównawczej analizy wielosekwencyjnej (ang. Multiple Sequence Alignment, MSA). Analizy dokonano porównując wybrany fragment sekwencji referencyjnej genomu człowieka oraz pięciu innych ssaków. Do tego celu wykorzystano oprogramowanie Clustal Omega 1.2.4 i Jalview 2.11.0.

Klasyfikacji wariantów dokonano z pomocą programu Varsome (<https://varsome.com/>) zgodnie z rekomendacjami Amerykańskiego Kolegium Genetyki Medycznej i Genomiki (ang. American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG). Na tej podstawie do dalszej analizy wytypowano warianty o charakterze patogennym, prawdopodobnie patogennym oraz o nieznanym znaczeniu klinicznym.

Nieopisane dotąd warianty patogenne oraz prawdopodobnie patogenne, wykryte w badanej grupie pacjentów, zostały zgłoszone do ogólnodostępnej bazy wariantów ClinVar pod afiliacją Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki.

5.5. Sekwencjonowanie metodą Sanger

Obecność zidentyfikowanych w badaniu NGS wariantów weryfikowano za pomocą sekwencjonowania metodą Sanger. Metodę wykorzystano również do przeprowadzenia analizy segregacji wariantów w rodzinie. Dla każdego wariantu zaprojektowano specyficzną parę starterów z wykorzystaniem programu Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), Primer3web (<https://primer3.ut.ee/>) oraz UCSC In-Silico PCR (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>). Dla wariantów zlokalizowanych w genie *COL1A1* i *COL1A2* zastosowano odpowiednio sekwencję referencyjną NM_000088.4 oraz NM_000089.4. Reakcję amplifikacji wybranych sekwencji (ang. Polymerase Chain Reaction, PCR) przeprowadzono z użyciem polimerazy GoTaq Master Mix (Promega, USA). Uzyskane produkty PCR następnie oczyszczono (ExoSAP-IT, Applied Biosystems, USA) i wyznakowano (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems, USA). Sekwencjonowanie próbek przeprowadzono na aparacie 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems, USA). Uzyskane wyniki analizowano z użyciem programu Mutation Surveyor V5.1.0 software (SoftGenetics, USA).

5.6. Analiza liczby kopii

Genomowe DNA pacjentów, u których nie wykryto wariantów sprawczych, poddano analizie metodą MLPA (ang. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) w celu identyfikacji delecji lub duplikacji w obrębie genów kolagenu typu 1. Procedurę przeprowadzono z użyciem komercyjnych zestawów dla genów *COL1A1* i *COL1A2* (SALSA MLPA P271 i P272 kit, MRC Holland, The Netherlands).

5.7. Analiza statystyczna

Istotność występowania poszczególnych cech klinicznych została oceniona przy użyciu testu χ^2 Cochran-Armitage dla trendu z korekcją Bonferroniego-Hochberga dla porównań wielokrotnych. Za istotne statystycznie uznano cechy, dla których wartość

„p” wyniosła $<0,05$. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu oprogramowania The R Project for Statistical Computing v4.2.1.

5.8. Analiza „regionów letalnych” z wykorzystaniem zasobów bazy OIVD

Zawarta w pracy analiza wariantów zlokalizowanych w „regionach letalnych” genów *COL1A1* i *COL1A2* oraz wariantów związanych z występowaniem typu 2 wrodzonej łamliwości kości opierała się na analizie ponad trzech tysięcy wariantów zgłoszonych do bazy wariantów związanych z wrodzoną łamliwością kości (ang. Osteogenesis Imperfecta Variant Database, OIVD) do stycznia 2020 roku. Na podstawie danych literaturowych określono lokalizację na poziomie nukleotydowym oraz aminokwasowym dwóch „regionów letalnych” w genie *COL1A1* oraz ośmiu „regionów letalnych” w genie *COL1A2*. Następnie obliczono stosunek liczby wariantów związanych z występowaniem formy letalnej oraz form nieletalnych dla każdego regionu oraz aminokwasu. Dodatkowo, przeanalizowano lokalizację wszystkich zmian związanych z typem 2 wrodzonej łamliwości kości zareportowanych w genach kolagenu typu I oraz proporcję liczby wariantów związanych z występowaniem formy letalnej oraz form nieletalnych dla każdego aminokwasu. Obliczeń dokonano na podstawie pozycji białkowej wariantów. Jeżeli pojedyncza zmiana spowodowała więcej niż jeden typ choroby, każdy typ był liczony jako osobny wariant. Analizowano wyłącznie rekordy powodujące substytucję glicyny o potwierdzonej patogenności oraz określonym typie choroby (typ 1, 2, 3 i 4 oraz typy pośrednie).

6. Omówienie wyników przedstawionych w cyklu publikacji

Publikacja 1

Salacińska 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-Krzyszkowska 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.

Cykl publikacji otwiera praca opisująca wyniki analizy wariantów w genach kolagenu typu I w grupie polskich pacjentów z wrodzoną łamliwością kości z zastosowaniem metody NGS. Jest to praca podsumowująca projekt naukowy 2016/IV/57-MN pt. "Genetyczne uwarunkowania wrodzonej łamliwości kości", realizowany w latach 2016-2021.

W pracy przedstawiono wyniki pierwszego badania nad podłożem genetycznym wrodzonej łamliwości kości u polskich pacjentów. Grupę badaną stanowiło 197 polskich pacjentów (180 rodzin) z podejrzeniem wrodzonej łamliwości kości, rekrutowanych przez sześć jednostek medycznych w latach 2016-2022. Na tle innych opublikowanych wyników, badana kohorta stanowi drugą najliczniejszą grupę wśród populacji europejskich (Włochy 295, Szwecja 164, Ukraina 94, Finlandia 54, Estonia 30 rodzin). Uzyskane wyniki podzielono na 3 główne sekcje: charakterystykę badanej populacji, analizę podłoża genetycznego oraz analizę cech fenotypowych pacjentów z potwierdzoną przyczyną choroby.

6.1. Charakterystyka badanej populacji

Po wykonaniu badania techniką NGS u wszystkich 197 pacjentów skierowanych do projektu, w wyniku reanalizy danych klinicznych, odrzucono ośmioro pacjentów. Wśród nich znalazła się 4 miesięczna dziewczynka z obciążonym wywiadem rodzinnym, dwoje bezobjawowych rodziców dzieci z ciężką postacią choroby oraz pięcioro pacjentów z niewystarczającymi wskazaniem, niejednoznacznym fenotypem lub wymagających diagnostyki różnicowej. Ostatecznie do dalszych analiz zakwalifikowano 189 pacjentów (175 rodzin): dwa płody, 137 dzieci i 50 dorosłych w wieku od 3 miesięcy do 46 lat w momencie zgłoszenia do badania. Na podstawie dostępnych danych klinicznych określono, iż 107 pacjentów prezentowało łagodny typ 1

wrodzonej łamliwości kości, 34 umiarkowany typ 4, 45 postępująco-deformujący typ 3, trzech letalny typ 2.

6.2. Podłoże genetyczne

Podrozdział podzielono na pięć odrębnych zagadnień: charakterystyka podłoża genetycznego w badanej grupie polskich pacjentów, analiza zidentyfikowanych wariantów, nowe warianty, analiza zmian zlokalizowanych w „regionach letalnych” oraz pacjenci z dwoma wariantami w genach kolagenu typu I.

6.2.1. Charakterystyka podłoża genetycznego w badanej grupie pacjentów

Warianty sprawcze zidentyfikowano u 108 badanych rodzin (119 pacjentów): metodą NGS w 106, metodą MLPA w dwóch przypadkach. U czterech pacjentów zidentyfikowano po dwa potencjalnie patogenne warianty w genach kolagenu typu I; ostatecznie, dla każdego z pacjentów wytypowano po jednym wariantie sprawczym. Wśród pacjentów z potwierdzeniem genetycznym choroby, dominującą grupę stanowiły osoby z łagodnym typem 1, następnie z postępująco-deformującym typem 3, umiarkowanym typem 4 i letalnym typem 2.

Patogenne zmiany w genie *COL1A1* zidentyfikowano w 76 rodzinach (85 pacjentów), a w genie *COL1A2* w 32 (34 pacjentów). Jedynie dziewięć wariantów wystąpiło niezależnie w przynajmniej dwóch niespokrewnionych rodzinach. Nie wykryto obecności zmian sprawczych w genach *COL1A1* oraz *COL1A2* u 70 pacjentów (67 rodzin) (Tabela 3).

Tabela 3. Charakterystyka podłoża genetycznego badanej grupy 175 rodzin z uwzględnieniem poszczególnych typów wrodzonej łamliwości kości (OI).

Typ OI	Liczba rodzin z mutacją w genie <i>COL1A1</i>	Liczba rodzin z mutacją w genie <i>COL1A2</i>	Liczba rodzin z mutacją w genach kolagenu typu I	Liczba rodzin bez mutacji w genach kolagenu typu I	Suma
1	40	5	45 (42%)	51	96 (55%)
2	3	0	3 (3%)	0	3 (1%)
3	25	13	38 (35%)	6	44 (26%)
4	8	14	22 (20%)	10	32 (18%)
Suma	76	32	108	67	175

6.2.2. Analiza zmian zidentyfikowanych w genach kolagenu typu I

W badanej grupie pacjentów wykryto 97 różnych wariantów sprawczych: 68 w genie *COL1A1* (70%), 29 w genie *COL1A2* (30%). Przy użyciu metody MLPA

zidentyfikowano dwie duże rearanżacje w postaci delecji 25 eksonów genu *COL1A1* oraz delecji 6 eksonów genu *COL1A2*. Dzięki zastosowaniu techniki NGS wykryto: 53 substytucje glicyny (ang. missense), 14 delecji pojedynczego nukleotydu zaburzających ramkę odczytu (ang. frameshift), 13 substytucji nukleotydu w regionach splicingowych (ang. splicing), 10 wariantów wprowadzających przedwczesną terminację łańcucha białkowego (ang. nonsense), jedną delecję niezaburzającą ramki odczytu (ang. in-frame deletion) oraz jedną insercję niezaburzającą ramki odczytu (ang. in-frame insertion). Większość zmian zidentyfikowanych metodą NGS była zlokalizowana w regionach helikalnych obu genów. Jedynie trzy warianty znajdowały się w regionie N-terminalnym i trzy w regionie C-terminalnym genu *COL1A1*. Zgodnie z efektem wywieranym przez poszczególne mutacje na cząsteczki kolagenu typu I określono, iż 65% wykrytych wariantów powoduje zmianę jakościową, a 35% zmianę ilościową. W ramach analizy poszczególnych grup mutacji określono związany z nimi fenotyp: warianty typu frameshift oraz nonsense zidentyfikowano u pacjentów z typem 1, mutacje splicingowe wykryto u pacjentów prezentujących wszystkie trzy nieletalne typy choroby, z kolei delecję i duplikację niezaburzającą ramki odczytu odpowiednio u pacjentów z typem 3 i 4. Najczęściej raportowane mutacje missense były odnotowane u pacjentów ze wszystkimi czterema typami choroby (Tabela 4). Dla każdego z siedmiu aminokwasów powodujących substytucję glicyny określono liczbę wykrytych wariantów oraz związany z nimi typ choroby.

Tabela 4. Liczba zmian zidentyfikowanych w genie *COL1A1* i *COL1A2* z podziałem na grupy wariantów, z uwzględnieniem poszczególnych typów wrodzonej łamliwości kości (OI).

<i>COL1A1</i>					
	OI 1	OI 2	OI 3	OI 4	Suma
Frameshift	15	-	-	-	15
Nonsense	10	-	-	-	10
Splicing	9	-	3	1	13
Missense	1	3	20	6	30
Suma	35 (52%)	3 (4%)	23 (34%)	7 (10%)	68
<i>COL1A2</i>					
	OI 1	OI 2	OI 3	OI 4	Suma
Frameshift	-	-	-	1	1
Splicing	-	-	1	2	3
In-frame deletion	-	-	1	-	1
In-frame insertion	-	-	-	1	1
Missense	3	-	10	10	23
Suma	3 (10%)	0 (0%)	12 (42%)	14 (48%)	29

6.2.3. Nowe warianty

Wśród 97 różnych wariantów opisanych w publikacji, 38 stanowiły nowe, nieraportowane wcześniej zmiany: 24 w genie *COL1A1*, 14 w genie *COL1A2*. Najliczniejszą grupą były substytucje (n=19), następnie delecje (n=10), warianty splicingowe (n=6), warianty nonsense (n=2), insercje (n=1). Spośród siedmiu aminokwasów powodujących zmianę glicyny w łańcuchu białkowym, zidentyfikowaliśmy pierwszą substytucję glicyny na tryptofan w genie *COL1A1*.

6.2.4. Analiza zmian zlokalizowanych w „regionach letalnych”

W badanej populacji zidentyfikowano siedem różnych zmian zlokalizowanych w „regionach letalnych” genów kolagenu typu I. Choć są one związane z występowaniem najcięższej - letalnej formy wrodzonej łamliwości kości, żaden z ośmiu pacjentów, u których zaraportowano powyższe zmiany, nie prezentował typu 2. Powyższemu zagadnieniu została w całości poświęcona publikacja nr. 2 wchodząca w skład prezentowanego cyklu.

6.2.5. Pacjenci z dwoma wariantami w genach kolagenu typu I

Na etapie analizy bioinformatycznej, u czterech pacjentów odnotowano po dwie zmiany zlokalizowane w genach kolagenu typu I potencjalnie związane z wystąpieniem objawów choroby. Były to połączenia wariantów klasy 1 lub 2 (wariant patogeny, wariant prawdopodobnie patogeny) z wariantami klasy 2 lub 3 (wariant prawdopodobnie patogeny, wariant o nieznanym znaczeniu klinicznym). W każdym z czterech przypadków, wariantem klasy 2 lub 3 była zmiana typu missense, jednakże wprowadzająca substytucję aminokwasu innego niż glicyna. Na podstawie dokładnej analizy informacji dostępnych w bazach danych, literaturze oraz po wykonaniu badań genetycznych u członków rodziny, ostatecznie dla każdego z pacjentów wytypowano po jednej zmianie sprawczej, co pozostaje w zgodności z autosomalnie dominującym sposobem dziedziczenia w tych genach w odniesieniu do wrodzonej łamliwości kości. Z kolei obecność drugiej zmiany - substytucji „nie-glicyny” - należy potraktować jako ewentualny czynnik modyfikujący lub dokonać reklasyfikacji wariantu na klasę 4 lub 5 (wariant prawdopodobnie łagodny, wariant łagodny).

6.3. Analiza fenotypowa pacjentów z potwierdzoną przyczyną choroby

W oparciu o grupę pacjentów z potwierdzoną przyczyną genetyczną wrodzonej łamliwości kości, wykonano analizę cech fenotypowych. Grupa ta liczyła 55 pacjentów

z typem 1, 23 z typem 4, 38 z typem 3 oraz trzech z typem 2, jednakże ze względu na niewielką reprezentację nie uwzględniono jej na dalszym etapie oceny.

Na podstawie danych klinicznych dla każdej z trzech grup określono: liczbę pacjentów płci męskiej i żeńskiej, wiek pacjentów w momencie rekrutacji, wzrost w centylach, liczbę złamań oraz liczbę złamań na rok. Porównano również częstość występowania poszczególnych cech pomiędzy pacjentami z typem 1, 3 i 4 z określeniem istotności statystycznej. Deformacje obecne w okresie prenatalnym, złamania kręgów, trójkątny kształt twarzy, Dentinogenesis imperfecta, ograniczenia mobilności, deformacje klatki piersiowej oraz kości długich występowały znacznie częściej w konkretnych grupach pacjentów, przez co mogą być uznane za charakterystyczne dla poszczególnych typów choroby. Z wyjątkiem złamań kręgów, częstość występowania pozostałych wymienionych wyżej cech rosła wraz z nasileniem objawów choroby. Z kolei niebieskie twardówki, wady słuchu i osteoporoza były w niemal równym stopniu obserwowane wśród pacjentów reprezentujących wszystkie trzy typy choroby, przez co nie mogą być uznane za charakterystyczne (nie wykazały istotności statystycznej).

Na przykładzie badanej grupy pacjentów uzyskane wyniki wykazały, że metoda NGS jest najbardziej kompleksowym narzędziem w diagnostyce wrodzonej łamliwości kości wśród polskich pacjentów. Identyfikacja nowych wariantów w genach kolagenu typu I przyczyniła się do powiększenia spektrum zmian związanych z patogenezą wrodzonej łamliwości kości. Z kolei upowszechnienie wyników w zakresie znanych wariantów w połączeniu z danymi klinicznymi, może przyczynić się w przyszłości do utworzenia modelu predykcyjnego określającego korelację genotyp-fenotyp, a także do opracowania skutecznego leczenia.

Publikacja 2

Salacińska 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.

W drugiej publikacji przedstawiono grupę siedmiu pacjentów z patogennymi wariantami zlokalizowanymi w „regionach letalnych” genów kolagenu typu I, opisywanych dotychczas jako miejsca związane z występowaniem najcięższej postaci wrodzonej łamliwości kości typu 2 (dotyczy wyłącznie zmian powodujących substytucję glicyny). Ze względu na fenotyp prezentowany przez pacjentów w badanej populacji polskiej – od formy łagodnej, poprzez postać o umiarkowanym nasileniu cech, po formę postępująco-deformującą – analizę poszerzono o dane pochodzące z różnych populacji dostępne w bazie OIVD.

Uzyskane wyniki zostały podzielone na cztery główne sekcje: opis kliniczny pacjentów, charakterystyka i klasyfikacja zidentyfikowanych wariantów, charakterystyka wszystkich wariantów skutkujących substytucją glicyny w obrębie „regionów letalnych”, analiza i lokalizacja wszystkich wariantów skutkujących substytucją glicyny związanych z występowaniem formy letalnej w genach *COL1A1* i *COL1A2*.

6.4. Analiza zmian zlokalizowanych w „regionach letalnych” zidentyfikowanych w badanej grupie pacjentów

W wyniku badania metodą NGS w populacji 166 osób z podejrzeniem wrodzonej łamliwości kości, wyodrębniono grupę siedmiu pacjentów z patogennymi wariantami zlokalizowanymi w „regionach letalnych” genów kolagenu typu I. Mutacje sprawcze wyłoniono na podstawie analizy bioinformatycznej, a ich obecność potwierdzono metodą sekwencjonowania Sangera. Pacjenci w wieku od 3 do 25 lat prezentowali objawy kliniczne o zróżnicowanym nasileniu odpowiadające wszystkim trzem nieletalnym typom wrodzonej łamliwości kości (typ 1, 3, 4).

6.4.1. Opis kliniczny pacjentów

W badanej grupie pacjentów zidentyfikowano siedem osób, u których wykryta mutacja sprawcza była zlokalizowana w obrębie „regionów letalnych” genów kolagenu

typu I. Pięcioro pacjentów prezentowało formę postępująco-deformującą (typ 3), jeden postać o umiarkowanym nasileniu cech (typ 4) oraz jeden pacjent łagodny typ wrodzonej łamliwości kości (typ 1).

6.4.2. Charakterystyka i klasyfikacja zidentyfikowanych wariantów

Wśród sześciu różnych wariantów zareportowanych w powyższej grupie, dwa były zlokalizowane w 1 „regionie letalnym” genu *COL1A1* i skutkowały substytucją glicyny w alaninę (p.Gly995Ala, p.Gly998Ala). Pozostałe cztery znajdowały się w regionie 2, 6, 7 oraz 8 genu *COL1A2* i powodowały substytucję glicyny w serynę oraz walinę (p.Gly556Val, p.Gly847Ser, p.Gly949Ser, p.Gly1072Val).

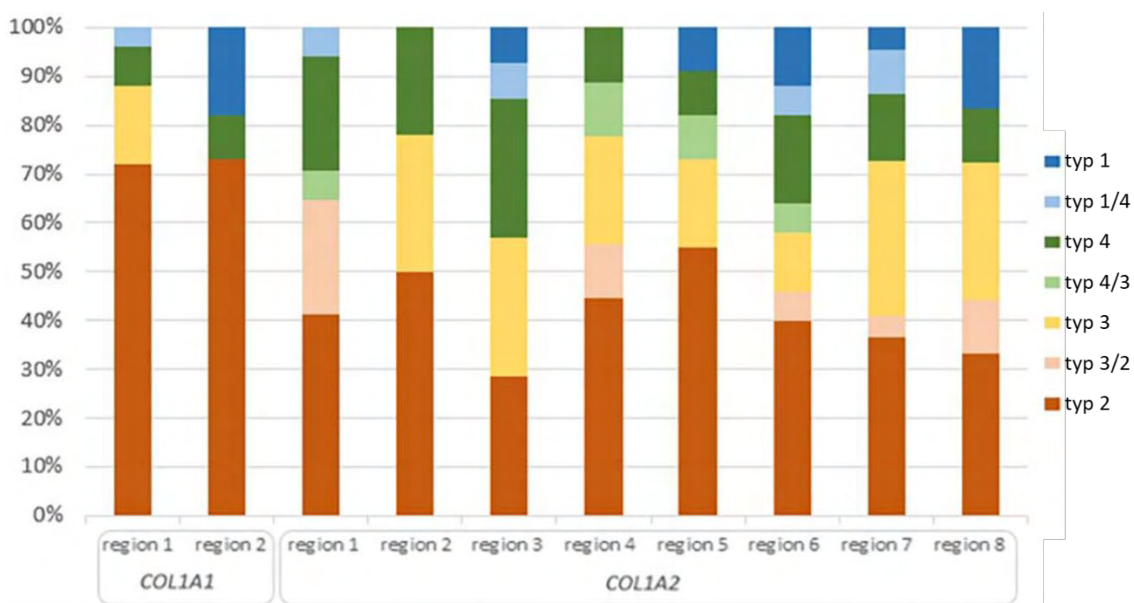
Zgodnie z danymi źródłowymi, wariant p.Gly847Ser był już opisany u trzech pacjentów z typem 1 oraz 4, z kolei zmiana p.Gly949Ser została odnotowana u dziewięciu osób z typem 3, 2 oraz pośrednim typem 2/3. Pozostałe cztery mutacje nie były wcześniej raportowane (p.Gly995Ala, p.Gly998Ala, p.Gly556Val, p.Gly1072Val). Na podstawie analizy bioinformatycznej, baz danych, literatury oraz zgodnie z klasyfikacją ACMG, charakter powyższych wariantów został określony jako patogeniczny lub prawdopodobnie patogeniczny.

6.5. Analiza „regionów letalnych” z wykorzystaniem zasobów bazy OIVD

Druga część pracy opierała się na analizie ponad trzech tysięcy wariantów zgłoszonych do bazy OIVD do stycznia 2020 roku. Na podstawie danych literaturowych określono lokalizację na poziomie nukleotydowym oraz aminokwasowym dwóch „regionów letalnych” w genie *COL1A1* oraz ośmiu „regionów letalnych” w genie *COL1A2*. Następnie obliczono stosunek liczby wariantów związanych z występowaniem formy letalnej oraz form nieletalnych dla każdego regionu oraz aminokwasu. Dodatkowo, przeanalizowano lokalizację wszystkich zmian związanych z typem 2 wrodzonej łamliwości kości zareportowanych w genach kolagenu typu I oraz proporcję liczby wariantów związanych z występowaniem formy letalnej oraz form nieletalnych dla każdego aminokwasu. Obliczeń dokonano na podstawie pozycji białkowej wariantów. Jeżeli pojedyncza zmiana spowodowała więcej niż jeden typ choroby, każdy typ był liczony jako osobny wariant. Analizowano wyłącznie rekordy powodujące substytucję glicyny o potwierdzonej patogenności oraz określonym typie choroby (typ 1, 2, 3 i 4 oraz typy pośrednie).

6.5.1. Charakterystyka wszystkich wariantów w obrębie „regionów letalnych”

W dwóch „regionach letalnych” genu *COL1A1* zareportowano łącznie 33 różne substytucje glicyny u 41 pacjentów, jednakże dwa warianty wiązały się z dwoma różnymi formami choroby, w związku z tym liczba zmian wzrosła do 36. Z kolei w ośmiu „regionach letalnych” genu *COL1A2* odnotowano 109 wariantów u 162 osób, z czego 15 było związanych z więcej niż jedną postacią OI, przez co liczba zmian wzrosła do 126. Wśród 36 różnych substytucji glicyny genu *COL1A1*, 26 (71%) spowodowało postać letalną wrodzonej łamliwości kości (w regionie 1: 18 z 25 wariantów, w regionie 2: 8 z 11 wariantów). W genie *COL1A2* łącznie 51 (40%) ze 126 wariantów było związanych z letalną postacią wrodzonej łamliwości kości, jednakże różnice między poszczególnymi regionami wynosiły od czterech do dziewięciu zmian (28-55%) (Rycina 4).



Rycina 4. Nasilenie cech klinicznych wariantów zlokalizowanych w „regionach letalnych” genów kolagenu typu I. Każdy z typów wrodzonej łamliwości kości został oznaczony innym kolorem. Wysokość słupków odpowiada procentowemu udziałowi wariantów związanych z występowaniem danego typu choroby.

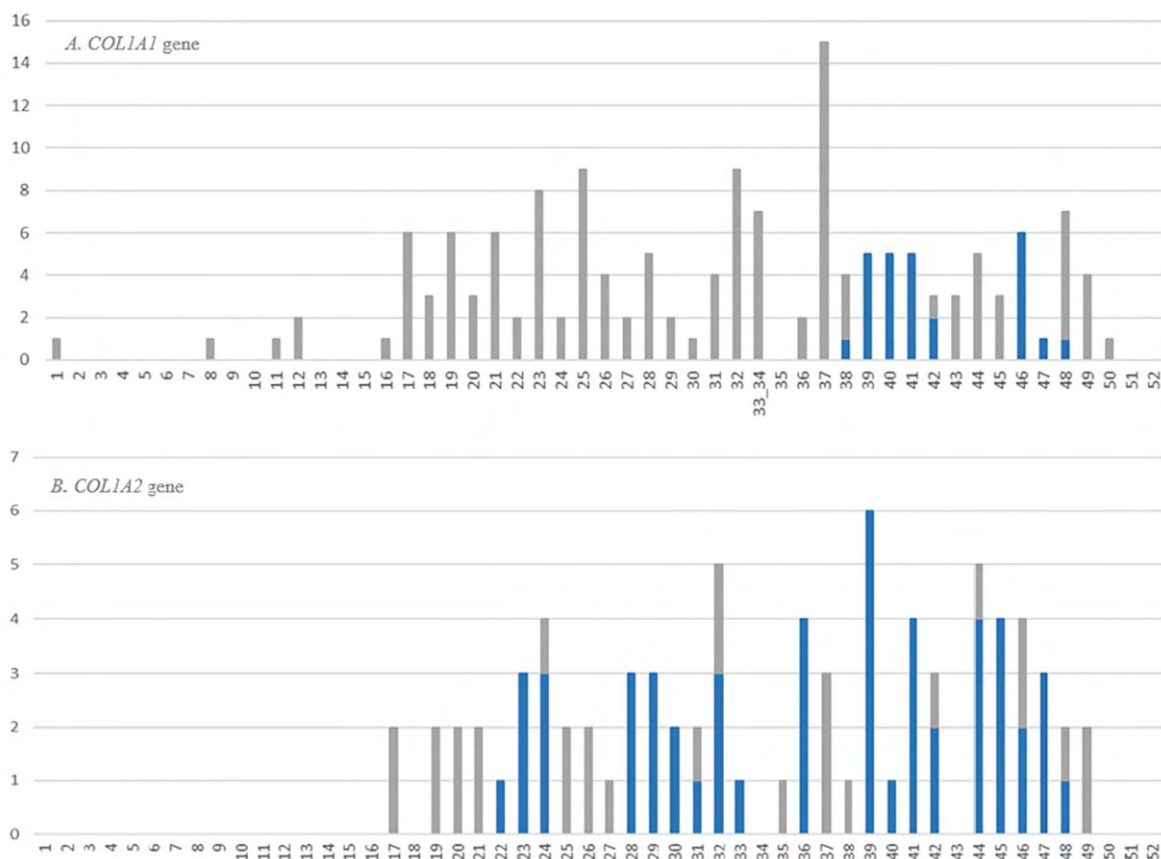
Szczegółowa analiza wykazała znaczne różnice w częstości występowania oraz nasileniu postaci choroby dla poszczególnych aminokwasów. W „regionach letalnych” genu *COL1A1*, odnotowano siedem różnych aminokwasów podstawiających glicynę. Liczba odnotowanych wariantów dla pojedynczego aminokwasu wahała się od 1 do 9, a liczba zmian powodujących postać letalną od 1 do 8. W obrębie „regionów letalnych” genu *COL1A1* każdy z aminokwasów był związany z przynajmniej jednym przypadkiem

letalnym. Wszystkie warianty powodujące substitucję glicyny na argininę, cysteinę oraz walinę skutkowały najcięższą formą wrodzonej łamliwości kości. Z kolei substitucje na serynę i kwas asparaginowy były związane z tą formą choroby w około 75%, kwas glutaminowy w 50%, a alaninę w 25%. W „regionach letalnych” genu *COL1A2*, odnotowano osiem różnych aminokwasów podstawiających glicynę. Liczba różnych wariantów dla pojedynczego aminokwasu wahała się od 1 do 38, a liczba zmian powodujących postać letalną od 1 do 18. W obrębie ośmiu „regionów letalnych” genu *COL1A2* wyłącznie fenyloalanina była związana tylko z formą letalną choroby, jednakże dla tego aminokwasu odnotowano zaledwie jeden wariant. Substitucje na argininę, kwas asparaginowy, cysteinę, kwas glutaminowy oraz walinę skutkowały niemal równą liczbą zmian letalnych i nieletalnych. Tylko jedna czwarta wariantów związanych z seryną warunkowała najcięższą postać choroby. Jedynie substitucje glicyny na alaninę nie były związane z typem 2 wrodzonej łamliwości kości.

6.5.2. Analiza i lokalizacja wszystkich wariantów w genach kolagenu typu I związanych z występowaniem formy letalnej

Na podstawie analizy dostępnych danych, określono iż 34% wariantów skutkujących substitucją glicyny w genie *COL1A1* i 17% w genie *COL1A2* było związanych z występowaniem letalnej postaci wrodzonej łamliwości kości. Warianty te były zlokalizowane odpowiednio w 38 i 30 z 52 eksonów powyższych genów, jednakże ich rozkład w sekwencji genów nie był regularny.

W genie *COL1A1* najwyższą liczbę wariantów letalnych zareportowano w eksonach położonych poza „regionami letalnymi”. Najwięcej zmian odnotowano w eksonie 37 (n=15), 25 (n=9) i 32 (n=9). Wśród eksonów odpowiadających lokalizacji „regionów letalnych” najwięcej - 6 wariantów odnotowano w eksonie 46. W genie *COL1A2* eksony z najwyższą liczbą wariantów letalnych korespondowały z położeniem „regionów letalnych”. Najwięcej takich zmian zareportowano w eksonie 39 (n=6), natomiast w eksonach położonych poza „regionami letalnymi” odnotowano maksymalnie 3 różne substitucje skutkujące typem 2 wrodzonej łamliwości kości (Rycina 5).



Rycina 5. Liczba i lokalizacja wariantów związanych z występowaniem letalnej postaci wrodzonej łamliwości kości w genie *COL1A1* i *COL1A2*. Oś Y wskazuje liczbę wariantów, oś X wskazuje kolejne eksony genu. Wysokość słupków odpowiada liczbie wariantów związanych z typem 2 odnotowanych w danym eksonie. Szare słupki odpowiadają wariantom położonym poza „regionami letalnymi”, niebieskie słupki odpowiadają wariantom położonym w obrębie „regionów letalnych”. „Regiony letalne” nie zawsze obejmują cały ekson.

Podobnie jak miało to miejsce dla „regionów letalnych”, szczegółowa analiza wykazała znaczne różnice w częstości występowania oraz nasileniu postaci choroby dla poszczególnych aminokwasów w zależności od genu.

Łączna liczba różnych wariantów dla pojedynczego aminokwasu w genie *COL1A1* wahała się od 16 do 152, a liczba zmian powodujących postać letalną od 5 do 34. Biorąc pod uwagę stosunek liczby wariantów letalnych do nie-letalnych, najwięcej zmian powodujących typ 2 było związanych z substytucją glicyny na hydrofobową walinę (64%). Dla aminokwasów z naładowanym łańcuchem bocznym (kwas asparaginowy, kwas glutaminowy, arginina) odnotowano niemal równą liczbę wariantów letalnych i nieletalnych, z kolei około jednej trzeciej wariantów należących do grupy małych aminokwasów (cysteina, seryna, alanina) skutkowałą najcięższą postacią choroby.

Łączna liczba odnotowanych wariantów dla pojedynczego aminokwasu w genie *COL1A2* wahała się od 1 do 121, a liczba zmian powodujących postać letalną od 0 do 25. Biorąc pod uwagę stosunek liczby zmian letalnych do nieletalnych, wyłącznie substytucje

glicyny przez aminokwasy hydrofobowe (leucyna, fenyloalanina) były związane tylko z formą letalną choroby, jednakże dla tych aminokwasów odnotowano zaledwie po jednym wariancie. Substytucje spowodowane przez aminokwasy o charakterze kwasowym (kwas asparaginowy, kwas glutaminowy) i hydrofobową walinę okazały się letalne w $\frac{1}{4}$, z kolei małe aminokwasy (cysteina, seryna) oraz arginina w 15%. Podobnie jak miało to miejsce w „regionach letalnych”, jedynie substytucje glicyny na alaninę nie były związane z typem 2 wrodzonej łamliwości kości.

Identyfikacja wariantów zlokalizowanych w „regionach letalnych”, u pacjentów prezentujących nieletalne formy choroby, przyczyniła się do podjęcia szerszej analizy korelacji genotypowo-fenotypowej. W jej wyniku ustalono aktualną liczbę wariantów odpowiedzialnych za wystąpienie letalnej postaci wrodzonej łamliwości kości w obrębie „regionów letalnych”. Być może uzyskane wyniki pomogą w określeniu nowych czynników powodujących występowanie najcięższej formy choroby.

Publikacja 3

Salacińska 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.

W ostatniej załączonej publikacji opisano pierwszą substytucję glicyny na tryptofan zlokalizowaną w genie *COL1A1*, u pacjentki z postępująco-deformującą postacią wrodzonej łamliwości kości. Choć praca ma charakter opisu przypadku, w świetle ogólnościowych badań nad korelacją genotypowo-fenotypową u pacjentów z wrodzoną łamliwością kości, opisany w niej wariant dostarcza nowych istotnych informacji na temat wpływu danego typu aminokwasu na obraz kliniczny pacjenta.

6.6. Zaraportowanie pierwszej substytucji glicyny na tryptofan w genie *COL1A1*

6.6.1. Opis kliniczny

Pacjentka z cechami wrodzonej łamliwości kości typu 3 została zakwalifikowana do projektu naukowego w wieku 11 lat. Wstępne rozpoznanie choroby postawiono w okresie niemowlęcym, kiedy doszło do pierwszego złamania kości udowej, potwierdzonego w badaniu „Babygram”. Wtedy również zaobserwowano trójkątny kształt twarzy oraz miękkie kości czaszki. Pacjentka doznała około 20 złamań kończyn górnych i dolnych, z czego ostatnie nastąpiło w wieku 13 lat. Waga i wzrost znajdują się poniżej 3 centyla. U pacjentki zaobserwowano szereg deformacji kostnych w postaci wygiętych i skróconych kończyn dolnych, beczkowatej klatki piersiowej oraz skrócenia odcinka piersiowo-lędźwiowego. Ponadto pacjentka cierpi na przykurcze w stawach kolanowych i łokciowych. Dodatkowo stwierdzono niebieskie zabarwienie twardówek, Dentinogenesis imperfecta oraz wyddatne czoło. Ostatnie badania densytometryczne z 2016 roku wykazały znacznie obniżoną gęstość mineralną kości (ang. Body Mineral Density, BMD). Pacjentka przeszła dwie operacje chirurgiczne, otrzymała 31 cykli leczenia bisfosfonianami, obecnie porusza się na wózku inwalidzkim lub przy pomocy dodatkowej asekuracji. Pacjentka jest drugim dzieckiem niespokrewnionej pary. Zarówno rodzice, jak i starszy brat nie mają cech wrodzonej łamliwości kości. Ze względu na brak możliwości wykonania badań genetycznych u zdrowych rodziców, należy założyć że wariant jest pochodzenia *de novo*.

6.6.2. Charakterystyka zidentyfikowanego wariantu

U pacjentki wykonano badanie metodą NGS z użyciem autorskiego panelu genów. Na podstawie analizy bioinformatycznej wytypowano wariant sprawczy, którego obecność potwierdzono metodą sekwencjonowania Sangera. Wykryty wariant c.733G>T jest zlokalizowany w eksonie 10 genu *COL1A1* i skutkuje substytucją glicyny na tryptofan w pozycji p.245 łańcucha białkowego. Zgodnie z klasyfikacją ACMG zmiana ma charakter prawdopodobnie patogenny. Wariant nie został odnotowany w populacyjnych bazach danych, a programy predykcyjne potwierdzają jego szkodliwy wpływ na gen/produkt genu. Dzięki zastosowaniu narzędzia do porównawczej analizy wielosekwencyjnej (MSA) potwierdzono konserwatywność ewolucyjną wykrytego wariantu. Ponadto mutacje wprowadzające substytucję glicyny są znanym mechanizmem związanym z patologią wrodzonej łamliwości kości.

Dotychczas w literaturze opisano zaledwie trzy przypadki substytucji glicyny na tryptofan, jednakże wszystkie dotyczą genu *COL1A2*. Choć cały czas raportowane są nowe warianty w genach kolagenu typu I, można powiedzieć, że opisana zmiana należy do grupy unikatowych. Wynika to z faktu, że w genie *COL1A1* występuje jedynie 10 loci, w których może dojść do podobnej substytucji. Zgodnie z proponowanym założeniem, nasilenie objawów choroby zależy od podobieństwa między cząsteczką glicyny a podstawiającym ją aminokwasem. Ma to związek z ograniczeniami przestrzennymi potrójnej helisy, gdzie co trzecim aminokwasem jest niewielka glicyna. Jako, że tryptofan jest aminokwasem obojętnym elektrycznie, ale posiadającym duży łańcuch boczny w postaci indolu, opisany powyżej przypadek potwierdza tę zależność.

7. Podsumowanie

Wrodzona łamliwość kości jest genetyczną chorobą tkanki łącznej należącą do grupy chorób rzadkich. Niezależnie od przyczyny, choroba związana jest z zaburzeniami cząsteczek kolagenu typu I, który występuje w wielu rodzajach tkanek, co przekłada się na szerokie spektrum cech klinicznych obserwowanych u pacjentów. Do najbardziej charakterystycznych objawów należą: liczne złamania, deformacje kości, niski wzrost, trójkątny kształt twarzy, osteoporoza, niebieskie zabarwienie twardówek i wady uzębienia. Choroba cechuje się zmiennym nasileniem objawów, od postaci niemal bezobjawowej, aż do letalnej. Różnice kliniczne obserwowane są między rodzinami z tym samym typem choroby, a także między spokrewnionymi pacjentami mającymi ten sam wariant sprawczy. Szacuje się, że u 85-90% chorych za wystąpienie wrodzonej łamliwości kości odpowiadają geny *COL1A1* oraz *COL1A2* kodujące cząsteczki kolagenu typu I. Wśród pozostałych 5-15% osób, patogeneza choroby związana jest z licznymi „genami niekolagenowymi”, których produkty białkowe zaangażowane są w złożone procesy wpływające m.in. na modyfikację i fałdowanie kolagenu, czy różnicowanie osteoblastów.

Mimo wielu lat badań, istotne zagadnienia, takie jak patogeneza choroby, określenie korelacji genotypowo-fenotypowej, czy opracowanie skutecznego leczenia, wymagają dalszych prac badawczych. Wyzwaniem i nadzieją dla lepszego poznania wrodzonej łamliwości kości wydaje się być nowoczesna, wysokoprzepustowa analiza genomowego DNA u pacjentów z klinicznymi objawami tej rzadkiej choroby. W ostatnich latach badania molekularne pozwoliły na identyfikację nowych czynników genetycznych oraz kolejnych wariantów w genach o potwierdzonym związku z wrodzoną łamliwością kości. Rozbudowanie bazy wariantów genetycznych, w połączeniu z wiedzą o spektrum i nasileniu objawów klinicznych pacjenta, daje możliwość określenia zależności genotypowo-fenotypowej, istotnej z punktu widzenia opieki medycznej i poradnictwa genetycznego. Co więcej, to właśnie spersonalizowana terapia oparta o diagnozę molekularną może być kluczem do opracowania skutecznego leczenia pacjentów z wrodzoną łamliwością kości.

Celem przedstawionej pracy było określenie podłoża genetycznego w grupie polskich pacjentów z wrodzoną łamliwością kości oraz poszukiwanie zmienności genetycznej w genach kolagenu typu I. Ponadto zaplanowano ustalenie związku genotypu

z obserwowanym efektem fenotypowym oraz określenie skuteczności metody sekwencjonowania następnej generacji w diagnostyce wrodzonej łamliwości kości.

Przedstawiony cykl publikacji jest wynikiem badań prowadzonych w latach 2016-2021 w ramach projektu naukowego. Grupę badaną stanowiło 197 polskich pacjentów z podejrzeniem wrodzonej łamliwości kości. Badaniem objęto materiał pochodzący od dwóch płodów oraz 137 pacjentów pediatrycznych i 50 dorosłych, w wieku od 3 miesięcy do 46 lat. Pacjenci pochodzenia kaukaskiego prezentowali zróżnicowane nasilenie cech klinicznych. U wszystkich pacjentów włączonych do projektu wykonano badanie metodą sekwencjonowania następnej generacji (NGS) z użyciem autorskiego panelu genów. W oparciu o analizę uzyskanych danych, wytypowano warianty mogące mieć związek z wystąpieniem objawów choroby. Obecność powyższych zmian potwierdzono metodą sekwencjonowania Sangera. Genomowe DNA pacjentów, u których nie wykryto wariantów sprawczych, poddano analizie metodą MLPA w celu identyfikacji delecji lub duplikacji w obrębie genów kolagenu typu 1. Badania obejmowały również porównanie częstości występowania poszczególnych cech klinicznych pomiędzy pacjentami z typem 1, 3 i 4 z określeniem istotności statystycznej. Ponadto wykonano analizę danych dostępnych w bazie OIVD, w celu oceny letalności wariantów odnotowanych dotąd w obszarze „regionów letalnych” oraz analizę wszystkich wariantów związanych z typem 2 wrodzonej łamliwości kości w genach kolagenu typu I, z uwzględnieniem ich lokalizacji oraz w odniesieniu do poszczególnych aminokwasów.

Efektem prowadzonych badań było scharakteryzowanie podłoża genetycznego w badanej grupie polskich pacjentów z wrodzoną łamliwością kości. W wyniku analizy genów kolagenu typu I określono, iż 98% zidentyfikowanych zmian stanowiły mutacje punktowe, natomiast 2% rozległe rearanżacje. Analiza lokalizacji wariantów sprawczych wykazała, że 70% zmian znajdowało się w genie *COL1A1*, a 30% w genie *COL1A2*. Zmiany punktowe były zlokalizowane niemal na całej długości obu genów. Nie zidentyfikowano regionów typu hot-spot lub zmian charakterystycznych dla badanej grupy pacjentów. W analizowanej grupie badawczej 82% rodzin posiadało „indywidualną” mutację sprawczą (ang. private mutation). Ustalono, iż warianty powodujące zmiany jakościowe cząsteczek kolagenu typu I stanowią 65% wykrytych zmian, a warianty powodujące zmiany ilościowe 35%. Na etapie analizy bioinformatycznej, u czterech pacjentów odnotowano po dwie zmiany położone w genach kolagenu typu I potencjalnie związane z wystąpieniem objawów choroby.

Na podstawie dokładnej analizy informacji dostępnych w bazach danych, literaturze oraz po wykonaniu badań genetycznych u członków rodziny, ostatecznie dla każdego z pacjentów wytypowano po jednej zmianie sprawczej.

Na podstawie analizy podłoża genetycznego wrodzonej łamliwości kości w badanej grupie pacjentów wykryto 97 różnych wariantów sprawczych zlokalizowanych w genach kolagenu typu I. Dwie zmiany stanowiły duże rearanżacje w postaci delecji 25 eksonów genu *COL1A1* oraz delecji 6 eksonów genu *COL1A2*. Wśród 95 mutacji punktowych wyróżniono następujące typy wariantów: 53 substytucje glicyny (ang. missense), 14 delecji pojedynczego nukleotydu zaburzających ramkę odczytu (ang. frameshift), 13 substytucji nukleotydu w regionach splicingowych (ang. splicing), 10 wariantów wprowadzających przedwczesną terminację łańcucha białkowego (ang. nonsense), jedną delecję niezaburzającą ramki odczytu (ang. in-frame deletion) oraz jedną insercję niezaburzającą ramki odczytu (ang. in-frame insertion). Na poziomie białkowym, najliczniejsza grupa wariantów typu zmiany sensu, była związana z substytucjami glicyny na siedem różnych aminokwasów. W oparciu o dostępne bazy wariantów, zidentyfikowano łącznie 38 nowych zmian, z czego 24 było zlokalizowanych w genie *COL1A1*, a 14 w genie *COL1A2*. Wśród wykrytych wariantów zidentyfikowano również pierwszą na świecie substytucję glicyny w tryptofan w genie *COL1A1*.

Odnosząc się do opisanych w literaturze zależności genotypowo-fenotypowych, określono wpływ zidentyfikowanych wariantów na nasilenie objawów klinicznych obserwowanych u pacjentów. Biorąc pod uwagę wpływ wariantu na cząsteczki kolagenu typu I, zmiany powodujące zaburzenia ilościowe były związane z łagodnym typem 1. Z kolei warianty wprowadzające zmiany strukturalne, u większości pacjentów skutkowały wystąpieniem cięższych postaci choroby (typ 2, 3, 4). Nawiązując do modelu gradientowego (ang. gradient model), tylko część zidentyfikowanych wariantów założeń o rosnącym nasileniu objawów zależnym od położenia względem końca C-terminalnego. Na podstawie założeń modelu regionalnego (ang. regional model) określono, iż siedem wariantów jest zlokalizowanych się w regionach związanych z letalną postacią choroby. Jednakże grupa ośmiu pacjentów, u których zidentyfikowano powyższe warianty, prezentowała cechy odpowiadające nieletalnym formom wrodzonej łamliwości kości. Co więcej analiza ponad trzech tysięcy wariantów zareportowanych dotąd w bazie OIVD wykazała, że 71% i 40% substytucji glicyny zlokalizowanych w „regionach letalnych” genu *COL1A1* i *COL1A2* odpowiada za wystąpienie letalnej postaci wrodzonej łamliwości kości. Odnosząc się do zależności między strukturą

aminokwasu powodującego substytucję glicyny zaobserwowano, że większość aminokwasów z elektrycznie naładowanym łańcuchem bocznym (arginina, kwas asparaginowy, kwas glutaminowy) oraz z rozgałęzionym hydrofobowym łańcuchem bocznym (walina) wiąże się z występowaniem ciężkiej postaci wrodzonej łamliwości kości. Podobnie, zareportowana po raz pierwszy substytucja glicyny w tryptofan w genie *COL1A1*, została zidentyfikowana u pacjentki z postępująco-deformującą formą choroby. Z kolei aminokwasy z małym łańcuchem bocznym (alanina, cysteina, seryna), korelowane dotychczas z łagodnym fenotypem, w badanej grupie pacjentów spowodowały wystąpienie typu 3 i 4.

Na podstawie uzyskanych wyników, skuteczność metody sekwencjonowania następnej generacji w diagnostyce wrodzonej łamliwości kości w badanej grupie pacjentów w zakresie analizy genów kolagenu typu I wyniosła między 47%, a 100%.

Podsumowując, wyniki uzyskane w niniejszym badaniu stanowią unikatowe źródło informacji o podłożu genetycznym wrodzonej łamliwości kości w grupie polskich pacjentów. Choć na tle innych badań przeprowadzonych w populacjach europejskich, zebrana grupa pacjentów jest jedną z najliczniejszych, stanowi ona jedynie grupę reprezentatywną. Biorąc pod uwagę częstość występowania wrodzonej łamliwości kości, szacunkowa liczba pacjentów w populacji polskiej wynosi między dwa, a cztery tysiące osób. Zatem dla pełnego określenia podłoża genetycznego choroby wśród polskich pacjentów, potrzebna jest kontynuacja badań. Dodatkowo, praca ogranicza się wyłącznie do analizy wariantów występujących w genach kolagenu typu I. Pełne określenie podłoża genetycznego w badanej grupie pacjentów wymaga przeprowadzenia dalszych analiz. Wśród 38% rodzin bez zidentyfikowanej mutacji sprawczej w genach kolagenu typu I, 12 wymaga potwierdzenia patogenicznego charakteru zmian zidentyfikowanych w „genach niekolagenowych”. U kilku pacjentów planowane jest także rozszerzenie diagnostyki o metodę WES lub WGS. Nie można również wykluczyć, że część pacjentów z bardzo łagodnymi objawami ma izolowaną osteoporozę i prawdopodobnie nie powinna zostać włączona do powyższego badania.

Mimo pewnych ograniczeń, uzyskane wyniki mogą przyczynić się do pogłębienia wiedzy na temat tej rzadkiej choroby. Nieopisane dotąd 38 warianty wykryte w badanej grupie pacjentów zostały zgłoszone do ogólnosiwiatowej bazy wariantów ClinVar pod afiliacją Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki, powiększając tym samym spektrum zmian związanych z patogenezą wrodzonej łamliwości kości. Upowszechnienie wyników w zakresie znanych wariantów w połączeniu z danymi klinicznymi, może przyczynić się

w przyszłości do utworzenia modelu predykcyjnego określającego korelację genotyp-fenotyp. Być może w dalszej perspektywie uzyskane wyniki przyczynią się również do opracowania skutecznego leczenia dedykowanego pacjentom z wrodzoną łamliwością kości.

Jak wskazują liczne badania, potwierdzenie choroby na poziomie molekularnym umożliwia indywidualizację postępowania klinicznego w aspekcie działań terapeutycznych oraz poradnictwa genetycznego. Pomimo zróżnicowanej skuteczności uzyskane wyniki wskazują, że metoda NGS jest najbardziej kompleksowym narzędziem w diagnostyce wrodzonej łamliwości kości również wśród polskich pacjentów. Gdyby w tej samej grupie osób wykonać najczęściej zlecane badanie sekwencjonowania wybranych eksonów metodą Sangera, identyfikacja mutacji sprawczej byłaby możliwa maksymalnie u 23% pacjentów.

8. Wnioski

Wyniki uzyskane w ramach przeprowadzonych badań umożliwiły na sformułowanie następujących wniosków:

1. Podłoże genetyczne wrodzonej łamliwości kości w badanej grupie polskich pacjentów wykazuje znaczne podobieństwa do innych populacji europejskich w zakresie udziału genów kolagenowych w patogenezie choroby.
2. Mimo wielu lat badań nad zmiennością genów kolagenu typu I, ponad jedną trzecią zidentyfikowanych w populacji polskiej zmian stanowiły nowe nieopisane wcześniej warianty, co wskazuje na niezwykle polimorficzność genów *COL1A1* i *COL1A2*.
3. Uzyskane wyniki potwierdzają, że wpływ wariantu na zmianę liczby lub struktury cząsteczek kolagenu typu I ma związek z nasileniem objawów klinicznych obserwowanych u pacjenta, ale utworzenie skutecznego modelu predykcyjnego, opartego o korelację genotypowo-fenotypową dla poszczególnych wariantów wymaga dalszych badań.
4. Uzyskane wyniki nie potwierdzają teorii modelu regionalnego, a tylko część zidentyfikowanych wariantów wpisuje się w założenia modelu gradientowego, dlatego zaproponowane przed wielu laty modele warto poddać weryfikacji na podstawie wyników w większej grupie badanej i innych populacjach.
5. Ze względu na dużą zmienność genetyczną i niewielką powtarzalność wariantów sprawczych między niespokrewnionymi rodzinami metoda sekwencjonowania następnej generacji jest najbardziej skutecznym narzędziem w diagnostyce wrodzonej łamliwości kości w populacji polskiej.

9. Piśmiennictwo

1. Steiner RD, Basel D. COL1A1/2 Osteogenesis Imperfecta. 2005 Jan 28 [Updated 2021 May 6]. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, et al., editors. GeneReviews [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2023. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1295/>
2. Marini JC, Dang Do AN. Osteogenesis Imperfecta. 2020 Jul 26. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, de Herder WW, Dhatariya K, Dungan K, Hofland J, Kalra S, Kaltsas G, Kapoor N, Koch C, Kopp P, Korbonits M, Kovacs CS, Kuohung W, Laferrère B, Levy M, McGee EA, McLachlan R, New M, Purnell J, Sahay R, Shah AS, Singer F, Sperling MA, Stratakis CA, Trencle DL, Wilson DP, editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000–. PMID: 25905334.
3. Marini JC, Forlino A, Bächinger HP, Bishop NJ, Byers PH, Paepe A, Fassier F, Fratzl-Zelman N, Kozloff KM, Krakow D, Montpetit K, Semler O. Osteogenesis imperfecta. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Aug 18;3:17052. doi: 10.1038/nrdp.2017.52. PMID: 28820180.
4. Basel D, Steiner RD. Osteogenesis imperfecta: recent findings shed new light on this once well-understood condition. *Genet Med*. 2009 Jun;11(6):375-85. doi: 10.1097/GIM.0b013e3181a1ff7b. PMID: 19533842.
5. Sillence DO, Senn A, Danks DM. Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta. *J Med Genet*. 1979 Apr;16(2):101-16. doi: 10.1136/jmg.16.2.101. PMID: 458828; PMCID: PMC1012733.
6. Van Dijk FS, Sillence DO. Osteogenesis imperfecta: clinical diagnosis, nomenclature and severity assessment. *Am J Med Genet A*. 2014 Jun;164A(6):1470-81. doi: 10.1002/ajmg.a.36545. Epub 2014 Apr 8. Erratum in: *Am J Med Genet A*. 2015 May;167A(5):1178. PMID: 24715559; PMCID: PMC4314691.
7. Unger S, Ferreira CR, Mortier GR, Ali H, Bertola DR, Calder A, Cohn DH, Cormier-Daire V, Girisha KM, Hall C, Krakow D, Makitie O, Mundlos S, Nishimura G, Robertson SP, Savarirayan R, Sillence D, Simon M, Sutton VR, Warman ML, Superti-Furga A. Nosology of genetic skeletal disorders: 2023 revision. *Am J Med Genet A*. 2023 May;191(5):1164-1209. doi: 10.1002/ajmg.a.63132. Epub 2023 Feb 13. PMID: 36779427; PMCID: PMC10081954..
8. Ben Amor IM, Glorieux FH, Rauch F. Genotype-phenotype correlations in autosomal dominant osteogenesis imperfecta. *J Osteoporos*. 2011;2011:540178. doi: 10.4061/2011/540178. Epub 2011 Sep 6. PMID: 21912751; PMCID: PMC3170785.
9. Pepin MG, Byers PH. What every clinical geneticist should know about testing for osteogenesis imperfecta in suspected child abuse cases. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2015 Dec;169(4):307-13. doi: 10.1002/ajmg.c.31459. Epub 2015 Nov 14. PMID: 26566591.
10. Dalglish R. The human type I collagen mutation database. *Nucleic Acids Res*. 1997 Jan 1;25(1):181-7. doi: 10.1093/nar/25.1.181. PMID: 9016532; PMCID: PMC146420.
11. Fan D, Takawale A, Lee J, Kassiri Z. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012 Sep 3;5(1):15. doi: 10.1186/1755-1536-5-15. PMID: 22943504; PMCID: PMC3464725.

12. Elektroniczna baza chorób człowieka uwarunkowanych genetycznie OMIM <https://www.omim.org/>
13. Trejo P, Rauch F. Osteogenesis imperfecta in children and adolescents-new developments in diagnosis and treatment. *Osteoporos Int.* 2016 Dec;27(12):3427-3437. doi: 10.1007/s00198-016-3723-3. Epub 2016 Aug 5. PMID: 27492436.
14. Byers PH, Wallis GA, Willing MC. Osteogenesis imperfecta: translation of mutation to phenotype. *J Med Genet.* 1991 Jul;28(7):433-42. doi: 10.1136/jmg.28.7.433. PMID: 1895312; PMCID: PMC1016951.
15. Cole WG, Dalgleish R. Perinatal lethal osteogenesis imperfecta. *J Med Genet.* 1995 Apr;32(4):284-9. doi: 10.1136/jmg.32.4.284. PMID: 7643358; PMCID: PMC1050377.
16. Bodian DL, Madhan B, Brodsky B, Klein TE. Predicting the clinical lethality of osteogenesis imperfecta from collagen glycine mutations. *Biochemistry.* 2008 May 13;47(19):5424-32. doi: 10.1021/bi800026k. Epub 2008 Apr 16. PMID: 18412368.
17. Marini JC, Forlino A, Cabral WA, Barnes AM, San Antonio JD, Milgrom S, Hyland JC, Körkkö J, Prockop DJ, De Paepe A, Coucke P, Symoens S, Glorieux FH, Roughley PJ, Lund AM, Kuurila-Svahn K, Hartikka H, Cohn DH, Krakow D, Mottes M, Schwarze U, Chen D, Yang K, Kuslich C, Troendle J, Dalgleish R, Byers PH. Consortium for osteogenesis imperfecta mutations in the helical domain of type I collagen: regions rich in lethal mutations align with collagen binding sites for integrins and proteoglycans. *Hum Mutat.* 2007 Mar;28(3):209-21. doi: 10.1002/humu.20429. PMID: 17078022; PMCID: PMC4144349.
18. Bodian DL, Chan TF, Poon A, Schwarze U, Yang K, Byers PH, Kwok PY, Klein TE. Mutation and polymorphism spectrum in osteogenesis imperfecta type II: implications for genotype-phenotype relationships. *Hum Mol Genet.* 2009 Feb 1;18(3):463-71. doi: 10.1093/hmg/ddn374. Epub 2008 Nov 7. Erratum in: *Hum Mol Genet.* 2009 May 15;18(10):1893-5. PMID: 18996919; PMCID: PMC2638801.
19. van Dijk FS, Byers PH, Dalgleish R, Malfait F, Maugeri A, Rohrbach M, Symoens S, Sistermans EA, Pals G. EMQN best practice guidelines for the laboratory diagnosis of osteogenesis imperfecta. *Eur J Hum Genet.* 2012 Jan;20(1):11-9. doi: 10.1038/ejhg.2011.141. Epub 2011 Aug 10. PMID: 21829228; PMCID: PMC3234509.
20. McInerney-Leo AM, Marshall MS, Gardiner B, Coucke PJ, Van Laer L, Loeys BL, Summers KM, Symoens S, West JA, West MJ, Paul Wordsworth B, Zankl A, Leo PJ, Brown MA, Duncan EL. Whole exome sequencing is an efficient, sensitive and specific method of mutation detection in osteogenesis imperfecta and Marfan syndrome. *Bonekey Rep.* 2013 Dec 4;2:456. doi: 10.1038/bonekey.2013.190. PMID: 24501682; PMCID: PMC3909233.
21. Stenton SL, Prokisch H. The Clinical Application of RNA Sequencing in Genetic Diagnosis of Mendelian Disorders. *Clin Lab Med.* 2020 Jun;40(2):121-133. doi: 10.1016/j.cl.2020.02.004. PMID: 32439064.
22. Stembalska A, Dudarewicz L, Śmigiel R. Lethal and life-limiting skeletal dysplasias: Selected prenatal issues. *Adv Clin Exp Med.* 2021 Jun;30(6):641-647. doi: 10.17219/acem/134166. PMID: 34019743.
23. Forlino A, Marini JC. Osteogenesis imperfecta. *Lancet.* 2016 Apr 16;387(10028):1657-71. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00728-X. Epub 2015 Nov 3. PMID: 26542481; PMCID: PMC7384887.

24. Marzin P, Cormier-Daire V. New perspectives on the treatment of skeletal dysplasia. *Ther Adv Endocrinol Metab.* 2020 Mar 3;11:2042018820904016. doi: 10.1177/2042018820904016. PMID: 32166011; PMCID: PMC7054735.
25. Dwan K, Phillipi CA, Steiner RD, Basel D. Bisphosphonate therapy for osteogenesis imperfecta. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016 Oct 19;10(10):CD005088. doi: 10.1002/14651858.CD005088.pub4. PMID: 27760454; PMCID: PMC6611487.
26. Botor M, Fus-Kujawa A, Uroczynska M, Stepień KL, Galicka A, Gawron K, Sieron AL. Osteogenesis Imperfecta: Current and Prospective Therapies. *Biomolecules.* 2021 Oct 10;11(10):1493. doi: 10.3390/biom11101493. PMID: 34680126; PMCID: PMC8533546.
27. Elektroniczna baza badań klinicznych www.clinicaltrials.gov

10. Streszczenie w języku polskim

Wrodzona łamliwość kości jest genetyczną chorobą tkanki łącznej, związaną z zaburzeniami cząsteczek kolagenu typu I. Choroba charakteryzuje się szerokim spektrum cech klinicznych oraz zmiennym nasileniem objawów, od postaci łagodnej po letalną. U podłoża wrodzonej łamliwości kości leżą liczne patogenne warianty zlokalizowane w wielu genach wpływających bezpośrednio lub pośrednio na cząsteczki kolagenu typu I. Mimo wielu lat badań, istotne zagadnienia takie jak patogeneza choroby, określenie korelacji genotypowo-fenotypowej, czy opracowanie skutecznego leczenia, wymagają dalszych badań. Biorąc pod uwagę rosnące znaczenie badań molekularnych w wymienionych aspektach, nadzieją dla pełnego poznania wrodzonej łamliwości kości wydaje się być nowoczesna, wysokoprzepustowa analiza genomowego DNA.

Celem pracy badania było określenie podłoża genetycznego w grupie polskich pacjentów z wrodzoną łamliwością kości oraz poszukiwanie zmienności genetycznej w genach o potwierdzonym udziale w patogenezie choroby. Ponadto planowano ustalić związek genotypu z obserwowanym efektem fenotypowym oraz określić skuteczność metody sekwencjonowania następnej generacji w diagnostyce wrodzonej łamliwości kości.

Badanie przeprowadzono w grupie 197 polskich pacjentów z podejrzeniem wrodzonej łamliwości kości, prezentujących zróżnicowane nasilenie cech klinicznych. Grupa pacjentów obejmowała zarówno przypadki prenatalne, jak i postnatalne w wieku od 3 miesięcy do 46 lat. U wszystkich pacjentów wykonano badanie metodą NGS z użyciem autorskiego panelu genów. Obecność patogennych wariantów, wyłonionych na podstawie analizy danych bioinformatycznych, została potwierdzona metodą sekwencjonowania Sangera. Genomowe DNA pacjentów, u których nie wykryto wariantów sprawczych, poddano analizie metodą MLPA w celu identyfikacji delecji lub duplikacji w obrębie genów kolagenu typu I. Badania obejmowały również porównanie częstości występowania poszczególnych cech klinicznych z określeniem istotności statystycznej. Ponadto wykonano analizę danych dostępnych w bazie OIVD, w celu oceny letalności wariantów odnotowanych dotąd w obszarze „regionów letalnych” oraz analizę wszystkich wariantów związanych z typem 2 wrodzonej łamliwości kości w genach kolagenu typu I.

Uzyskane wyniki badań zostały opublikowane w formie trzech odrębnych publikacji. W pierwszej publikacji przedstawiono wyniki pierwszego badania nad

podłożem genetycznym wrodzonej łamliwości kości w grupie polskich pacjentów. Uzyskane wyniki podzielono na 3 główne sekcje: charakterystykę badanej populacji, analizę podłoża genetycznego oraz analizę cech fenotypowych pacjentów z potwierdzoną przyczyną choroby. Do najważniejszych wyników opisanych w publikacji należy identyfikacja 97 różnych zmian położonych w genach kolagenu typu I, w tym wykrycie 38 nowych wariantów. Określono również wpływ zidentyfikowanych wariantów na nasilenie objawów klinicznych oraz istotność statystyczną występowania poszczególnych cech klinicznych pomiędzy pacjentami z typem 1, 3 i 4. W drugiej publikacji przedstawiono grupę siedmiu pacjentów z patogennymi wariantami położonymi w „regionach letalnych” genów kolagenu typu I. Wbrew pierwotnym założeniom, wykryte warianty były związane z występowaniem nieletalnych form choroby. Analiza wszystkich substytucji glicyny zareportowanych dotąd w bazie OIVD wykazała, że 71% i 40% zmian zlokalizowanych w „regionach letalnych” genu *COL1A1* i *COL1A2* odpowiada za wystąpienie letalnej postaci wrodzonej łamliwości kości. Z kolei analiza wszystkich wariantów typu missense związanych z typem 2 wykazała, iż 17% zmian w genie *COL1A1* i 64% w genie *COL1A2* odpowiada lokalizacji „regionów letalnych”. W ostatniej publikacji opisano pierwszą na świecie substytucję glicyny na tryptofan zlokalizowaną w genie *COL1A1* zidentyfikowaną u pacjentki z postępująco-deformującą postacią wrodzonej łamliwości kości.

Uzyskane wyniki badań mogą przyczynić się do pogłębienia wiedzy na temat rzadkiej choroby jaką jest wrodzona łamliwość kości. Nieopisane dotąd warianty wykryte w badanej grupie pacjentów powiększają spektrum zmian związanych z patogenezą choroby. Upowszechnienie wyników w zakresie znanych wariantów w połączeniu z danymi klinicznymi, może również pomóc w utworzeniu modelu predykcyjnego określającego korelację genotyp-fenotyp. Być może w przyszłości uzyskane wyniki pomogą w opracowaniu skutecznego leczenia dedykowanego pacjentom z wrodzoną łamliwością kości.

11. Streszczenie w języku angielskim

Osteogenesis imperfecta is a genetic disorder of connective tissue, caused by factors associated with collagen type I molecules disruption. The disease is characterised by a wide spectrum of clinical features and variable severity of symptoms, ranging from mild to lethal. The genetic background is correlated with presence of numerous pathogenic variants located in several genes that directly or indirectly affect type I collagen molecules. Despite many years of research, important issues such as the pathogenesis of the disease, the genotype-phenotype correlation, and the development of an effective treatment require further research. Taking into account the growing importance of molecular research in the above-mentioned aspects, the chance for a full understanding of osteogenesis imperfecta is to be found in modern, high-throughput genomic DNA analysis.

The aim of the study was to determine the genetic background in a group of Polish patients with osteogenesis imperfecta and to search for genetic variability in genes with a confirmed involvement in the pathogenesis of the disease. Additionally, it was planned to establish the relationship between the genotype and the observed phenotypic effect and to determine the effectiveness of the next-generation sequencing method in the diagnostics of osteogenesis imperfecta.

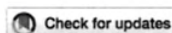
The next generation sequencing analysis, using custom designed gene panel, was performed in a group of 197 Polish patients suspected with osteogenesis imperfecta. The study group included both prenatal and postnatal cases, ranging from 3 months to 46 years. Patients presented variable degree of clinical features. Based on the analysis of bioinformatics data, the presence of selected pathogenic variants was confirmed by Sanger sequencing. The genomic DNA of patients who tested negative was analyzed using the MLPA method to identify deletions or duplications within the type I collagen genes. The study also included a comparison of the prevalence of particular clinical features using statistical tools. Additionally, an analysis of the data retrieved from the OIVD database to assess the lethality of variants recorded in the "lethal regions" and an analysis of all variants associated with type 2 osteogenesis imperfecta in the type I collagen genes were performed.

The distinct aspects of obtained results were reported in three separate publications. The first publication presents the results of the first study on the genetic basis of osteogenesis imperfecta in a group of Polish patients. The obtained results were

described in three main sections: characteristics of the studied population, analysis of the genetic background and phenotypic characteristics of patients with a confirmed cause of the disease. The most important results include the identification of 97 variants located in the type I collagen genes, among them 38 were novel. The genotype-phenotype correlation and the statistical significance of the occurrence of particular clinical features between patients with types 1, 3 and 4 were also determined. The second publication reports seven patients with pathogenic variants located in the "lethal regions" of type I collagen genes. Contrary to the original assumptions, the detected variants were associated with the occurrence of non-lethal forms of the disease. The review of all glycine substitutions annotated in the OIVD database showed that 71% and 40% of changes located in the "lethal regions" of *COL1A1* and *COL1A2* genes are responsible for the occurrence of OI type 2. In turn, the analysis of all missense variants leading to fatal outcome showed that 17% of changes reported in the *COL1A1* gene and 64% in the *COL1A2* gene correspond to the location of "lethal regions". The last publication describes the first glycine-to-tryptophan substitution located in the *COL1A1* gene, identified in a patient with a progressive-deforming form of osteogenesis imperfecta.

The presented results may contribute to broadening knowledge about this rare disease. Previously undescribed variants detected in the studied group expand the spectrum of changes related to the pathogenesis of the disease. Dissemination of results regarding known variants, combined with clinical data, may also contribute towards creating a predictive model determining the genotype-phenotype correlation. Perhaps in the long term, the results obtained will help in developing an effective treatment dedicated to patients with osteogenesis imperfecta.

12. Wydrukowane publikacje



OPEN ACCESS

EDITED BY
Gudrun Stenbeck,
Brunel University London, United Kingdom

REVIEWED BY
Jessica J Alm,
Karolinska Institutet (KI), Sweden
Gerard Pals,
Amsterdam University Medical Center,
Netherlands

*CORRESPONDENCE

Kinga Satacińska
✉ kinga.satacinska@iczm.p.edu.pl

RECEIVED 23 January 2023
ACCEPTED 18 August 2023
PUBLISHED 22 September 2023

CITATION

Satacińska 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, Gizewska M, Stecewicz I,
Walczak M, Rybak-Krzyszowska M,
Lewiński A and Gach A (2023) NGS
analysis of collagen type I genes in Polish
patients with Osteogenesis imperfecta:
a nationwide multicenter study.
Front. Endocrinol. 14:1149982.
doi: 10.3389/fendo.2023.1149982

COPYRIGHT

© 2023 Satacińska, Pinkier, Rutkowska,
Chlebna-Sokół, Jakubowska-Pietkiewicz,
Michałus, Kępczyński, Salachna, Wieczorek-
Cichecka, Piotrowicz, Chilarska, Jamsheer,
Matusik, Wilk, Petriczko, Gizewska,
Stecewicz, Walczak, Rybak-Krzyszowska,
Lewiński and Gach. This is an open-access
article distributed under the terms of the
Creative Commons Attribution License
(CC BY). The use, distribution or
reproduction in other forums is permitted,
provided the original author(s) and the
copyright owner(s) are credited and that
the original publication in this journal is
cited, in accordance with accepted
academic practice. No use, distribution or
reproduction is permitted which does not
comply with these terms.

NGS analysis of collagen type I genes in Polish patients with Osteogenesis imperfecta: a nationwide multicenter study

Kinga Satacińska^{1*}, Iwona Pinkier¹, Lena Rutkowska¹,
Danuta Chlebna-Sokół², Elżbieta Jakubowska-Pietkiewicz³,
Izabela Michałus⁴, Łukasz Kępczyński¹, Dominik Salachna¹,
Nina Wieczorek-Cichecka¹, Małgorzata Piotrowicz¹,
Tatiana Chilarska¹, Aleksander Jamsheer⁵, Paweł Matusik⁶,
Małgorzata Wilk⁷, Elżbieta Petriczko⁷, Maria Gizewska⁷,
Iwona Stecewicz⁷, Mieczysław Walczak⁷,
Magda Rybak-Krzyszowska⁸, Andrzej Lewiński⁴
and Agnieszka Gach¹

¹Department of Genetics, Polish Mother's Memorial Hospital Research Institute, Lodz, Poland,

²Department of Bone Metabolic Diseases, University Centre of Paediatric, Medical University of Lodz,
Lodz, Poland, ³Department of Pediatrics, Newborn Pathology and Bone Metabolic Diseases, Medical
University of Lodz, Lodz, Poland, ⁴Department of Endocrinology and Metabolic Diseases, Polish
Mother's Memorial Hospital Research Institute, Lodz, Poland, ⁵Department of Medical Genetics,
Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland, ⁶Department of Pediatrics, Pediatric Obesity
and Metabolic Bone Diseases, Faculty of Medical Sciences in Katowice, Medical University of Silesia,
Katowice, Poland, ⁷Department of Pediatrics, Endocrinology, Diabetology, Metabolic Disorders and
Cardiology of Developmental Age, Pomeranian Medical University, Szczecin, Poland, ⁸Department of
Obstetrics and Perinatology, University Hospital, Kraków, Poland

Osteogenesis imperfecta (OI) is a rare genetic disorder of the connective tissue. It presents with a wide spectrum of skeletal and extraskeletal features, and ranges in severity from mild to perinatal lethal. The disease is characterized by a heterogeneous genetic background, where approximately 85–90% of cases have dominantly inherited heterozygous pathogenic variants located in the *COL1A1* and *COL1A2* genes. This paper presents the results of the first nationwide study, performed on a large cohort of 197 Polish OI patients. Variants were identified using a next-generation sequencing (NGS) custom gene panel and multiplex ligation probe amplification (MLPA) assay. The following OI types were observed: 1 (42%), 2 (3%), 3 (35%), and 4 (20%). Collagen type I pathogenic variants were reported in 108 families. Alterations were observed in $\alpha 1$ and $\alpha 2$ in 70% and 30% of cases, respectively. The presented paper reports 97 distinct causative variants and expands the OI database with 38 novel pathogenic changes. It also enabled the identification of the first glycine-to-tryptophan substitution in the *COL1A1* gene and brought new insights into the clinical severity associated with variants localized in "lethal regions". Our results contribute to a better understanding of the clinical and genetic aspects of OI.

KEYWORDS

osteogenesis imperfecta, connective tissue disorder, collagen type I, *COL1A1*, *COL1A2*, next-generation sequencing

1 Introduction

Osteogenesis imperfecta (OI) belongs to a group of rare genetic disorders with a prevalence of 1–5/10,000 (ORPHA 666). The disease is associated with aberrations of collagen type I; as this structural protein is found in various connective tissues, the condition is characterized by a wide spectrum of clinical features. The most characteristic include fractures following minor trauma, bending of long bones, and growth deficiencies. In addition, craniofacial (macrocephaly, flat midface, and triangular-shaped face), chest, and spinal deformities are observed. Patients may also develop extraskeletal features, such as blue-colored sclerae, hearing loss, abnormal dentition (dentinogenesis imperfecta), joint hyperlaxity, reduced lung function, and cardiac defects (1, 2).

According to the current classification, OI is divided into five clinical types: OI type 1—non-deforming with persistently blue sclerae; OI type 2—a perinatal lethal form; OI type 3—characterized by progressive deformation; OI type 4—a moderate form with normal sclerae; OI type 5—with calcification of the interosseous membranes and/or hypertrophic callus (3, 4). This subdivision corresponds to the severity of symptoms, based on clinical and radiological features, without taking into account the genetic background.

In approximately 85%–90% of cases, the genetic cause of OI is associated with dominantly inherited mutations in the *COL1A1* and *COL1A2* genes encoding collagen type I molecules, resulting in quantitative or qualitative aberrations (1, 4). Among patients negative for collagen type I mutations, expanded molecular testing has revealed the presence of causative variants in several non-collagen genes. According to the OMIM (Online Mendelian Inheritance in Men) classification, 22 types of the disease have been described; however, the list is constantly expanding (5). Types I–IV are associated with mutations in genes encoding collagen type I, while the remainder are linked to genes encoding proteins involved in its biosynthesis, folding, post-translational modifications, bone mineralization, and osteoblast differentiation (6–8).

Although research into OI commenced over four decades ago, several issues concerning its genetic and clinical aspects remain challenging. This paper presents the results of a population-based study performed in a group of Polish patients with OI. It is the first nationwide study to describe the genetic background of this rare disease. We hope that our findings will support a wide range of healthcare professionals during clinical diagnosis and molecular screening.

2 Materials and methods

2.1 Subjects

The study population included 197 individuals from 180 families suspected of OI recruited by six Polish medical health centers in the years 2016–2022. The study group comprised prenatal and postnatal cases, aged 3 months to 46 years at the time of assessment. Patients were of Caucasian origin and presented a variable spectrum of clinical features. Medical information was derived from a questionnaire and

medical records. Clinical evaluation was performed according to the Sillence classification. Informed consent was obtained from all participants or their legal guardians.

2.2 DNA isolation

Genomic DNA was automatically isolated from peripheral blood leucocytes using MagCore Genomic DNA Whole Blood Kit (RBC Bioscience, Taiwan). A manual Sherlock AX kit (A&A Biotechnology, Poland) was used for the amniotic fluid and umbilical cord.

2.3 Next-generation sequencing

Next-generation sequencing (NGS) was used to resequence the exons and flanking non-coding sequences of the selected genes. Two slightly different custom gene panels were applied, as the production of the reagents has been discontinued in the meantime. For 166 patients, the panel included genes for OI types I–XVII, OI-related disorders, and those that may participate in the pathogenesis of OI (9). For 31 patients, the gene set covered OI types I–XIX and OI-related disorders. Both panels were designed using Illumina DesignStudio software according to the GenBank reference for GRCh37. Libraries were prepared according to the manufacturer's protocol for TruSeq Custom Amplicon and AmpliSeq On-Demand kits (Illumina, USA). The pooled libraries were sequenced on the MiniSeq platform (Illumina, USA).

2.4 Data analysis

Bioinformatics data processing, read quality control, and primary variant filtering were performed using VariantStudio software (Illumina, USA). Potentially causative mutations were selected according to the internal pipeline and analyzed using the Varsome interpretation tool (<https://varsome.com/>). Mutations were checked for population frequency values for the European non-Finnish population (gnomAD Exomes, gnomAD Genomes), and the impact on genes or gene products was determined according to *in silico* predictive programs. Moreover, variant databases (dbSNP, ClinVar, HGMD, and LOVD) and available literature were checked for additional information. For previously undescribed variants, the conservation score was performed using Multiple Sequence Alignment analysis across species (Clustal Omega 1.2.4; Jalview 2.11.0 software). Finally, variant classification was performed according to the ACMG guidelines (1—pathogenic, 2—likely pathogenic, 3—variant of uncertain significance, 4—likely benign, 5—benign).

2.5 Sanger sequencing

Targeted Sanger sequencing was performed to validate the presence of candidate variants revealed by NGS [*COL1A1*: LRG_1

(t1), NM_000088.4; *COL1A2*: LRG_2(t1), NM_000089.4]. The results considered variants that were pathogenic, likely pathogenic, or of unknown significance. In case of a confirmed mutation, family screening was made. PCR products were prepared with custom-designed primers, cleaned (ExoSAP-IT, Applied Biosystems, USA), and labeled (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems, USA). After sequencing on an 8-capillary 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA), the results were analyzed with Mutation Surveyor V5.1.0 software (SoftGenetics, USA).

2.6 Multiplex ligation probe amplification

Patients negative for NGS variant filtering were subjected to multiplex ligation probe amplification (MLPA) analysis of the *COL1A1* and *COL1A2* genes (SALSA MLPA P271 and P272 kit, MRC Holland).

2.7 Statistical analysis

Phenotypic severity was assessed using the χ^2 Cochran-Armitage test for trend and stepwise Bonferroni correction for multiple comparisons (Bonferroni-Hochberg procedure). Values of $p < 0.05$ were treated as statistically significant. Statistical analysis was performed using The R Project for Statistical Computing software (v. 4.2.1).

3 Results

3.1 The study population

The targeted NGS analysis was performed for 197 patients (180 families), i.e., 168 simplex and 12 family cases (29 patients). After careful reconsideration, eight patients were excluded from general calculations. Of this group, five individuals had insufficient indications for examination, needed differential diagnosis, or presented an unclear phenotype, while the other three were unaffected family members, i.e., parents of siblings with severe and lethal forms (Family 11) and a 4-month-old girl with a family history of OI (Family 6).

Finally, 189 patients from 175 families presented features of OI and were included in further analysis. The study population consisted of two fetuses, 137 children and teenagers (i.e., below 18 years old) and 50 adults. Prior to genetic testing and based on available clinical information, 107 patients (96 families) were classified as having mild type 1, 34 (32 families) had moderate type 4, and 45 (44 families) were assigned to progressively deforming type 3. The study population included three cases of lethal OI type 2. The first child had been tested prenatally from the amniotic fluid at 12 weeks of gestation but died before labor; the second was stillborn and had post-mortem screening performed from an umbilical cord; the third had a molecular test performed from a blood sample at the age of 6 months, and died before the age of 1 year.

3.2 Genetic background

Causative variants were identified in 108 families (119 patients), in 106 cases (117 patients) using the NGS technique, and in the other two using the MLPA assay. In four probands, two potentially pathogenic changes located in the collagen type I genes were reported (Section 3.2.4). Finally, for each patient, only one variant suspected to have a more significant impact on clinical manifestation was included in the general calculations. Briefly, for the *COL1A1* and *COL1A2* genes, pathogenic variants were found in 76 (85 individuals) and 32 (34 individuals) families, respectively. In the study cohort, nine variants were observed in at least two unrelated families; i.e., c.1001delC, c.1678G>A, c.1821 + 1G>A, c.2596G>A, c.3076C>T, c.3118G>A and c.3421C>T were noted in *COL1A1*, while c.892G>A and c.2845G>A were found in *COL1A2*. No causative variants were found in the collagen type I genes in 67 families (70 patients) (Table 1).

3.2.1 Collagen type I genes variant analysis

A total of 97 distinct alterations were identified, i.e., 68 located in the *COL1A1* and 29 in the *COL1A2* gene. Of these, 38 have not been described previously (Supplementary Materials; Table 1).

Only two large rearrangements identified through the MLPA assay include a 25-exon deletion in *COL1A1* and a 6-exon deletion in *COL1A2*, which were found in patients with mild and moderate phenotypes, respectively.

Using the NGS custom gene panel, we identified 53 glycine substitutions, 14 single-nucleotide deletions, 13 splice site alterations, 10 nonsense variants, 1 in-frame deletion, and 1 in-frame insertion. In *COL1A1*, point mutations were evenly distributed along the entire gene. The vast majority were located in the triple helical region, except for three mapped to the N-terminal (c.68C>T, c.189C>A, c.386delC) and three located in the C-terminal regions (c.4171C>T, c.4332dupC, c.4248 + 1G>A). In the *COL1A2*, all variants were mapping to the triple helical domain, starting from intron 14 (Supplementary Materials; Table 1).

Frameshift and nonsense variants, identified solely in the $\alpha 1$ chain, were exclusively associated with mild outcomes. Splice site alterations, reported in both collagen genes, caused a range of non-lethal phenotypes. A single in-frame deletion and insertion, located in the $\alpha 2$ chain, caused progressively deforming and moderate outcomes, respectively. The most frequently reported missense mutations resulted in all four clinical types of OI, of which the majority lead to progressively deforming ($n = 30$) and moderate ($n = 16$) manifestations (Table 2).

The number and severity of particular amino acids substituting for glycine vary between collagen type I genes. Among eight different amino acids, the most prevalent were serine substitutions, with 22 distinct variants identified in the study population. Together with arginine and valine, it was associated with all clinical types of the disease. Alanine, cysteine, and aspartic acid substitutions caused moderate and progressively deforming phenotypes, while single glutamic acid and tryptophan substitutions were associated with progressively deforming OI (Table 3).

TABLE 1 Distribution of OI types in the study population of 175 families.

OI type	Number of families with COL1A1 variant	Number of families with COL1A2 variant	Total number of families with identified variant	Number of families without identified variant	Total
1	40	5	45 (42%)	51	96 (55%)
2	3	0	3 (3%)	0	3 (1%)
3	25	13	38 (35%)	6	44 (26%)
4	8	14	22 (20%)	10	32 (18%)
Total	76	32	108	67	175

3.2.2 Novel variants

A total of 38 novel pathogenic variants were identified, i.e., 24 located in the *COL1A1* gene and 14 located in the *COL1A2* gene. Among these, 19 new missense changes were found, and these resulted in the full range of OI types. Single arginine and aspartic acid substitutions caused progressively deforming and moderate outcomes, respectively, while the alanine and cysteine variants resulted in both progressively deforming and moderate phenotypes. The most variable clinical manifestation was observed for serine and valine substitutions: in the $\alpha 2$ chain, they resulted in all non-lethal forms of the disease. Only one novel lethal variant was associated with valine substitution located in exon 19 of the $\alpha 1$ chain.

Among seven distinct amino acids altering conservative glycine residues, we reported the first tryptophan substitution located in the *COL1A1* gene. The novel variant c.733G>T p.(Gly245Trp), found in a patient with OI type 3, has been described in a separate publication by our team (10). A single in-frame deletion and insertion were observed in patients with progressively deforming

and moderate outcomes, respectively; both were located in the $\alpha 2$ chain. Regardless of localization in the $\alpha 1$ chain, seven novel frameshift and two nonsense variants caused OI type 1. A 25-exon deletion, encompassing exons 1–25 of the *COL1A1* gene, was identified in a family with mild phenotype, while deletion of exons 6–12 of the *COL1A2* gene was associated with a moderate manifestation. The six splicing variants resulted in mild and progressively deforming phenotypes; however, no pattern was found at the DNA level that could explain its variable severity (Supplementary Materials; Table 1).

3.2.3 Lethal regions

In the study population, eight patients presented nonlethal phenotypes with pathogenic glycine substitutions mapped in the “lethal regions”. Two mutations were located in the *COL1A1* (c.2984G>C and c.2993G>C) gene and five in the *COL1A2* (c.1667G>T, c.2539, c.2845G>A, c.2873G>T, and c.3215G>T) gene. Patients harboring six of these variants have been described

TABLE 2 Number and severity of variants reported in *COL1A1* and *COL1A2* genes.

COL1A1					
	OI 1	OI 2	OI 3	OI 4	Total
Frameshift	15	–	–	–	15
Nonsense	10	–	–	–	10
Splicing	9	–	3	1	13
Missense	1	3	20	6	30
Total	35 (52%)	3 (4%)	23 (34%)	7 (10%)	68
COL1A2					
	OI 1	OI 2	OI 3	OI 4	Total
Frameshift	–	–	–	1	1
Splicing	–	–	1	2	3
In-frame deletion	–	–	1	–	1
In-frame insertion	–	–	–	1	1
Missense	3	–	10	10	23
Total	3 (10%)	0 (0%)	12 (42%)	14 (48%)	29

TABLE 3 Number and severity of amino acids substituting for glycine reported in COL1A1 and COL1A2 genes.

Amino acid	ALA		ARG		ASP		CYS		GLU		SER		TRP		VAL		Total	
	COL1A1	COL1A2	COL1A1	COL1A2	COL1A1	COL1A2	COL1A1	COL1A2	COL1A1	COL1A2	COL1A1	COL1A2	COL1A1	COL1A2	COL1A1	COL1A2	COL1A1	COL1A2
OI 1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	1	3
OI 2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	3	0
OI 3	5	0	1	3	0	2	2	1	1	0	9	3	1	0	1	1	20	10
OI 4	2	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	6	0	0	3	1	6	10
Total	7	0	3	4	0	3	2	2	1	0	11	11	1	0	5	3	30	23

in detail in our separate publication (9). The newly reported mutation c.2873G>T was identified in a 13-year-old boy presenting OI type I. The patient with no extraskeletal features, a history of three vertebral fractures, and severe osteoporosis had recently started bisphosphonate treatment.

3.2.4 Patients harboring two variants

In the present study, four patients were found to harbor two alterations with potential causative impact located in the collagen type I genes, i.e., variant class 1 or 2 in conjunction with variant class 2 or 3 (Supplementary Materials; Table 2).

The first patient (P7569) with OI type I harbors a known pathogenic deletion c.3008delC and a novel substitution c.992C>T p.(Ala331Val) located in the COL1A1 gene. According to the ACMG guideline, the novel variant was classified as likely pathogenic. The performed family screening revealed the presence of both changes in the patient's mother, who also presented an OI phenotype. Owing to the cis-allele location of the variants, the frameshift that causes NMD is probably of overriding importance and is responsible for the mild manifestation observed in the patient and his mother.

The second individual (P25) was classified with OI type III. The patient demonstrated a novel mutation c.3182G>T p.(Gly1061Val) in conjunction with a known variant c.4081G>A p.(Glu1361Lys) located in the COL1A1 gene. The LOVD and HGMD databases have reported similar glycine substitutions in the same protein position, viz., p.Gly1061Asp (CM9000070) and p.Gly1061Ser (CM940294), both resulting in OI type II. The non-glycine substitution has been described in the LOVD as pathogenic; however, no article is available. Interestingly, the Varsome interpretation tool, dbSNP, and ClinVar databases classify p.(Glu1361Lys) as a variant of unknown significance. Similarly, in the HGMD, it is linked to a publication that describes a variant in position p.1361 (CM1411904); however, this results in a glycine-to-valine substitution located in the COL1A2 gene. As the non-glycine substitution was later identified in the patient's unaffected mother and siblings, we suggest variant reclassification.

The third case (P55) was attributed to OI type III, which harbors glycine and non-glycine substitutions located in the COL1A1 and COL1A2 genes, respectively. The first variant c.2155G>A p.(Gly719Ser), of *de novo* appearance, has been previously reported as a single causative alteration in several databases in patients with OI type III. The second variant c.2123G>A p.(Arg708Gln), inherited from the unaffected mother, was classified as likely pathogenic. However, the ClinVar database and several publications indicate it to have a benign impact. Similarly to our observed case, a non-glycine change has previously been reported with a different pathogenic glycine substitution (11). According to these findings, variant c.2123G>A should be reclassified as benign.

The last patient (P103) has a known splicing alteration c.2452-2A>G located in the COL1A1 gene and a novel non-glycine substitution c.2642A>C p.(Glu881Ala) in the COL1A2 gene. The newly identified variant has uncertain clinical significance and has been lately described with a different splicing mutation (12). Hence, the c.2642A>C variant inherited from an unaffected mother should be recognized as benign.

3.3 Phenotype analysis

The prepared clinical characteristics of Polish OI patients cover only individuals with a proven molecular diagnosis of the disease. According to this, 55 patients represented mild type 1, 38 represented progressively deforming type 3, and 23 represented moderate type 4 (Table 4). In the study population, only three individuals had lethal OI type 2. Because of such little representation, they were not included in the statistical analysis; however, they were described at the end of the section.

The study population demonstrated nearly equal representation of male and female patients (55 vs. 64). Regardless of the OI type, the age of the patients at the time of molecular assessment spanned from infancy to adults in their mid-40s.

The height distribution was concordant with the general phenotypic characteristics of different OI types. Patients attributed to mild type 1 covered the entire scope of the height percentile grid, while the height range significantly decreased with increasing severity of symptoms. The mean number of low-energy trauma per year also increased with disease severity, i.e., 0.65 for mild, 1.10 for moderate, and 3.25 for the progressively deforming group. However, a specific number of fractures for individual probands varied within and among OI types. In the study population, only three patients presenting mild type 1, aged 4 months (P10437), 6 months (P105), and 9 years (P835), did not

experience any injury. In contrast, the highest numbers, viz., 100, 120, and 130 fractures, occurred in older patients aged 14, 11, and 35 years (P33, P115, and P2208), respectively. They were all diagnosed as having OI type 3 and experienced their first fracture in the prenatal or neonatal period. Most of the probands with moderate and progressively deforming manifestations experienced their first fracture before 12 months of age. In turn, the majority of individuals with mild outcomes sustained their first fracture between 12 and 24 months of age, which falls in the period of upright standing. Interestingly, the latest first fracture occurred similarly in all groups at the age of 6 to 8 years.

The performed analysis indicates that prenatal presentation, triangular-shaped face, dentinogenesis imperfecta, vertebral fractures, chest and long bone deformations, and consequently mobility problems were significantly associated with particular OI types. For each of these features, the number of affected patients increased with disease severity. Only vertebral fractures showed a reverse trend. Interestingly, prenatal presentation, observed as *in utero* fractures or skeletal deformations, was reported in a single patient with a mild phenotype. Although the patient demonstrated bone deformations, detected by prenatal ultrasound, no fractures were sustained after birth, and only slightly bent upper and lower limbs, and blue sclerae, were noted (P10437).

Among mild cases, any reported mobility problems were mostly periodical and occurred after fractures. Walking with support was

TABLE 4 Clinical characteristics of the study population after molecular testing divided by OI type.

	OI type I	OI type IV	OI type III	p-Value
Number of patients	55	23	38	n/a
Sex, M/F	27/28	10/13	18/20	n/a
Age	4 mo–46 yo	3–37 yo	6 mo–37 yo	n/a
Height (centile)	<3 to 97	<3 to 25–50	<3 to 3–10	n/a
No. of fractures	0–38	2–40	1–130	n/a
No. of fractures per year	0–3.13	0.06–3.67	0.46–15.38	n/a
Prenatal deformations/fractures	1/54 (2%)	5/17 (29%)	35/37 (95%)	<0.05
Vertebral fractures	21/53 (40%)	6/23 (26%)	3/37 (8%)	<0.05
Chest deformations	12/54 (22%)	12/23 (52%)	30/38 (79%)	<0.05
Upper limbs deformations	9/54 (17%)	8/23 (35%)	34/38 (89%)	<0.05
Lower limbs deformations	16/54 (30%)	16/23 (70%)	38/38 (100%)	<0.05
Mobility problems	8/55 (16%)	9/23 (43%)	25/29 (86%)	<0.05
Triangular shaped face	13/53 (25%)	8/20 (40%)	24/37 (65%)	<0.05
Dentinogenesis imperfecta	8/55 (15%)	13/23 (59%)	25/38 (74%)	<0.05
Blue sclerae	50/54 (93%)	18/23 (78%)	35/38 (92%)	>0.05
Hearing impairment	5/55 (9%)	3/23 (14%)	5/38 (13%)	>0.05
Osteopenia/osteoporosis	33/45 (73%)	18/22 (82%)	21/21 (100%)	>0.05
Pharmacological treatment	14/55 (28%)	15/23 (75%)	35/38 (92%)	n/a
Inheritance F/S/U	29/6/20	7/6/10	2/18/18	n/a

mo, months old; yo, years old; F, familial; S, sporadic; U, unknown, n/a, not analyzed.

Differences in total number of patients for particular features are caused by missing data or when assessment was not applicable.

most commonly noted in the moderate group, and could be related to more severe bone deformations and valgus of the knee joints. Only one patient with type 4 was using a wheelchair due to skeletal deformities and reduction of muscle tone. In the type 3 group, 10 patients had mobility problems, 13 used a wheelchair, and 2 were immobile because of respiratory problems and delayed psychomotor development. The use of pharmacological treatment among patients with different OI types is in line with the increasing severity of skeletal deformations and the number of fractures. Treatment commencement ranged between the ages of 2 and 34 years in patients with a mild phenotype, between 1 month and 15 years for individuals with moderate outcome, and between the newborn period and 17 years in the most severe cases.

Interestingly, the presence of blue sclerae, hearing impairment, and low BMD (body mineral density) were not significantly related to the severity of OI. Blue sclerae were reported in the majority of patients enrolled in the study (90%) representing all non-lethal OI types, i.e., 93% of OI type 1 cases, 92% of OI type 3, and 78% of OI type 4. Hearing impairment was the least prevalent extraskeletal feature among OI patients, with frequency ranging between 9% and 14% of cases. Lowered BMD observed as osteopenia and osteoporosis was diagnosed in 72 out of 88 individuals, and applies to the results at the time of evaluation, regardless of the therapy. For 28 patients, the BMD value was missing; i.e., BMD was not evaluated in OI type 1 cases, perhaps due to very mild outcome, or in OI type 3, this was due to difficulty in performing densitometry tests in infants and young children.

Three cases of lethal OI were reported in the present study. A novel variant c.1247G>T p.(Gly416Val) was identified in a male fetus presenting features of OI in week 12 of gestation. The performed ultrasound examination showed bowing and shortening of long bones, chest deformations, and poor skull calcification. A second mutation c.2533G>A p.(Gly845Arg) was reported in an 11-month-old girl primarily diagnosed with very severe progressively deforming OI type 3 with intrauterine fractures, chest and long bone deformities, and respiratory problems. Eventually, she died soon after the molecular test was performed, indicating long-surviving OI type 2B (13). A third mutation c.3541G>A p.(Gly1181Ser) was observed in a male fetus with skeletal abnormalities and fractures visible at week 13 of gestation. Preterm delivery occurred at week 34 of pregnancy; however, the baby was stillborn. Variants c.2533G>A and c.3541G>A have been already noted in the lethal cases (14).

4 Discussion

Our analysis of 108 families in a Polish population with genetically confirmed OI found OI types 1, 2, 3, and 4 to account for 42%, 3%, 35%, and 20%, respectively. This is very close to a previous clinical study performed by Rusińska et al. (44/33/21%), as well as for the Ukrainian cohort published by Zhytnik et al. (47/17/34%) (12, 15). Interestingly, in Italian and Scandinavian populations, the percentage of mild type 1 was relatively higher (68–77%) (16–18).

Depending on the clinical type, the applied methods allowed for molecular confirmation of the disease in 47% to 100% of tested families. A higher success rate was associated with more severe manifestations.

Overall, no pathogenic variant in the collagen type I genes was found in 38% of families. In this group, probable causative mutations were detected in non-collagen genes in 12 cases; however, family segregation or functional studies are needed to confirm the pathogenicity of the variants. We suspect that some of the undiagnosed patients presenting uncertain manifestations, with only bone fragility and no extraskeletal features, may have isolated osteoporosis. However, as the clinical outcome of OI is very broad, it cannot be excluded that the patients may have displayed an ultra-mild presentation associated with yet unknown genetic loci. In the remaining patients, we plan to expand our diagnostic methodology with WES or WGS. In other European population studies, no mutations were found in 10% to 36% of probands (12, 16–18).

The genetic background analysis of OI in the present Polish population found that 70% demonstrated the $\alpha 1$ pathogenic variant and 30% demonstrated the $\alpha 2$ variant; this result is the same as described in the literature (4). However, the percentage of qualitative (65%) and quantitative (35%) variants in collagen type I genes noted in the Polish population differed from the results in other European cohorts, where structural alterations account for 30% to 57%, respectively (12, 16–19).

Single-nucleotide variants and small deletions/duplications were detected using an NGS custom gene panel and constituted 98% of the identified changes. Large deletions and duplications, which usually account for 1%–2% of the OI cases, were identified in two individuals with a commercial MLPA assay (4).

It has been widely observed that variants causing an OI phenotype are usually unique and rarely repeated between unrelated individuals (4). In the present study cohort, no hot spot was found to be characteristic of the studied Polish OI population, as only 9 out of 97 pathogenic changes occurred, in a maximum of three unrelated families. Therefore, among the 108 families presented in this paper, 88 were identified to have a “private mutation”. Interestingly, unrelated patients harboring a common variant were found to present the same clinical type.

Our findings reveal the presence of 38 previously unreported pathogenic variants. Although the number of novel mutations is surprisingly high (39% of all identified changes), they are commonly observed in other cohorts, i.e., Swedish 31%, Ukrainian 43%, Estonian 50%, and Finnish 84% (12, 17–19).

The clinical outcome of the newly identified alterations, as well as previously reported variants, is in line with the general rule regarding the quantitative or qualitative effects of the mutation on the collagen chain (6, 7, 20, 21). According to this, all single-nucleotide deletions and nonsense variants caused OI type 1. This also includes a large 25-exon deletion containing the first exon of the *COL1A1* gene resulting in the null-allele and mild presentation. The variable clinical outcome of reported splicing alterations is also consistent with previous findings. Since several factors influence this complex process, it is not surprising that mutations altering exon–intron junctions may result in a full phenotypic range from

mild to lethal (20, 22). Owing to the variable effect of splicing mutations on the collagen chains, it is hard to define how a particular variant affected mRNA without further functional studies. Thus, we suspect that nine changes lead to intron retention or exon skipping with frameshift (OI type 1 cases), while seven caused in-frame alteration (OI type 3 and 4 cases). Similarly, the six-exon deletion reported in the *COL1A2* gene most probably caused an in-frame alteration and thus OI type 4. The very rare in-frame mutations reported in the present study resulted in OI types 3 and 4. Although they are categorized as structural aberrations, the phenotype often remains unknown, as some variants can undergo NMD (4, 20).

The outcome of the identified missense variants leading to qualitative changes is mostly in line with previous findings, as they were predominantly reported in patients with severe phenotypes (i.e., 92%) (4, 8, 21).

Because of the highly variable manifestation of missense mutations, over the years, several factors have been considered to determine their severity (4, 21, 23). The heterogeneous nature of glycine substitutions was correlated with its position in the alpha chain, with greater clinical severity observed closer towards the C-terminal end due to its essential role in triple-helix formation (24–27). Based on obtained data, the gradient model appears to be valid to some extent. Thus, we are reluctant to draw any reliable conclusions based on the overall number of reported mutations (30 in $\alpha 1$ and 23 in $\alpha 2$) and particular amino acids substituting for glycine (1–11 in a single gene).

It has also been hypothesized that the phenotype of substituting residue is correlated with its identity to glycine; indeed, the majority of charged (arginine, aspartic acid, and glutamic acid) and hydrophobic (valine) amino acids result in severe outcomes (4, 6, 27). This rule also applied to the *COL1A1* tryptophan for glycine substitution c.733G>T, p.(Gly245Trp) identified in our study for the first time. As tryptophan is a large, non-polar aromatic amino acid containing an indole side chain, the observed progressively deforming phenotype is in line with this principle. In contrast, small amino acids (alanine, cysteine, and serine) correlated with a milder outcome, were mostly responsible for OI types 3 and 4. Interestingly, the mild and lethal cases reported in our study were caused by the same amino acids, i.e., small serine, charged arginine, and hydrophobic valine.

Referring to the regional model, significant mortality has been associated with mutations mapping to two clusters dispersed along *COL1A1*, and eight dispersed along *COL1A2* (2, 23, 27). Despite their crucial role in maintaining interactions between collagen and other extracellular molecules, variants altering these regions have since been reported to result in non-lethal and intermixed phenotypes. In the study cohort, eight individuals were found to present nonlethal outcomes despite having pathogenic glycine substitutions in the "lethal regions". Based on our present results and other literature reports, mortality of collagen type I mutations seems to be dependent on yet unknown factors or a combination of several variables (23, 25).

In the present study, four patients were found to harbor two variants of potential causative impact located in the collagen type I genes. In each case, one of the changes was a non-glycine

substitution. Performed family screening and detailed data analysis indicated that the identified non-glycine variants should be considered as not responsible for clinical manifestation of the disease. Thus, the presented cases question whether non-glycine substitutions have a deleterious impact. Moreover, it highlights difficulties that can be encountered while interpreting variants and emphasizes the importance of family testing in the context of variant prioritization. However, the possible role of non-glycine alterations as a modifying factor cannot be excluded and requires careful investigation, as similar cases have been reported (12, 17).

The phenotype spectrum observed in the Polish OI population reflects the heterogeneous nature of the disease. Although the available literature provides characteristics for each class, clinical evaluation remains subjective, as particular types present overlapping manifestations.

In our present study cohort, both skeletal and extraskeletal features were observed among patients representing all clinical types of the disease. However, prenatal presentation, vertebral fractures, triangular-shaped face, dentinogenesis imperfecta, mobility impairment, and chest and long bone deformations were significantly more common in certain forms and can be recognized as distinguishing between types. Except for vertebral fractures, the frequency of the remaining features was increasing with disease severity. In contrast, blue sclerae, hearing impairment, and osteoporosis were evenly distributed among different OI types, showing no correlation.

Comparisons with other populations are difficult, as the scope of analyzed phenotype characteristics differs between studies. However, similar trends regarding mobility and chest and long bone deformations were noted in a Ukrainian cohort (12). The most consistent observation refers to dentinogenesis imperfecta, which was noted in the Italian, Swedish, and Ukrainian populations (12, 16, 17). Statistical significance was also observed for triangular-shaped face among the Italian OI patients (16). Compared to the Polish population, vertebral fractures reported in the Swedish cohort are more frequently reported in patients with the moderate and progressively deforming OI types (17).

In several European studies, colored sclerae were observed in 33% to nearly 90% of patients assigned to type 4, which is formerly described as moderate with normal sclerae (4, 12, 16, 17). Interestingly, in our study, 78% of patients clinically attributed to this group also exhibited a colored hue, including four adults. Similar to our study, this feature was evenly reported in all three non-lethal types in the Ukrainian cohort, while blue sclera was statistically significant in the Italian and Swedish studies, being the most frequent among mild cases (12, 16, 17). This observation not only questions the initial classification of these patients but also highlights the problem of the criteria being used. Nevertheless, in those four cases, we upheld the decision, referring to other phenotypic features concordant with type 4.

Similar to earlier literature reports, some patients harboring collagen type I pathogenic variants did not exhibit any fractures or extraskeletal features (7, 15). However, the medical evaluation is based on a composite of all features present at the given time. Thus, especially in young patients, clinical presentation may change during life, with some of the diagnostic features, i.e., blue sclerae, dentinogenesis imperfecta, fractures, hearing impairment, or

Wormian bones, becoming apparent at a particular age. Moreover, the natural course of the disease can be influenced by pharmacological treatment (2, 4, 28, 29).

The results of our study performed on the Polish population indicate that OI due to collagen type I gene defects presents a wide spectrum of clinical and genetic heterogeneity. As such, further studies are needed, and each one will play an important role in expanding our knowledge about the disease.

Data availability statement

The data presented in the study are deposited in the ClinVar repository, accession numbers can be found in the [Supplementary Material Table 3](#).

Ethics statement

The studies involving humans were approved by Ethics Committee of Polish Mother's Memorial Hospital Research Institute. The studies were conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements. Written informed consent for participation in this study was provided by the participants' legal guardians/next of kin.

Author contributions

Conceptualization, KS and AG; Methodology, KS and AG; Validation, AG; Formal Analysis, KS and ŁK; Investigation, KS, IP, LR; Resources, KS, DC-S, EJ-P, IM, ŁK, AG, NW-C, MP, TC, DS, AJ, PM, MW (14th author), EP, MG, IS, MW (18th author), MR-K, AL; Data Curation, KS and DS; Writing – Original Draft Preparation, KS; Writing – Review & Editing, AG; Visualization, KS; Supervision, AG; Project Administration, KS; Funding Acquisition, KS and AG. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

References

- Forlino A, Marini JC. Osteogenesis imperfecta. *Lancet* (2016) 387(10028):1657–71. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00728-X
- Basel D, Steiner RD. Osteogenesis imperfecta: recent findings shed new light on this once well-understood condition. *Genet Med* (2009) 11(6):375–85. doi: 10.1097/GIM.0b013e3181a1ff7b
- Mortier GR, Cohn DH, Cormier-Daire V, Hall C, Krakow D, Mundlos S, et al. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2019 revision. *Am J Med Genet A*. (2019) 179(12):2393–419. doi: 10.1002/ajmg.a.61366
- Steiner RD, Basel D. COL1A1/2 osteogenesis imperfecta. In: Adam MP, Everman DB, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Amemiya A, editors. *GeneReviews*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle (2021). p. 1993–2022.
- OMIM database. Available at: <https://www.omim.org/>.
- Van Dijk FS, Sillence DO. Osteogenesis imperfecta: clinical diagnosis, nomenclature and severity assessment. *Am J Med Genet A*. (2014) 164A(6):1470–81. doi: 10.1002/ajmg.a.36545
- Trejo P, Rauch F. Osteogenesis imperfecta in children and adolescents-new developments in diagnosis and treatment. *Osteoporos Int* (2016) 27(12):3427–37. doi: 10.1007/s00198-016-3723-3
- Kang H, Aryal ACS, Marini JC. Osteogenesis imperfecta: new genes reveal novel mechanisms in bone dysplasia. *Transl Res* (2017) 181:27–48. doi: 10.1016/j.trsl.2016.11.005
- Sałacińska K, Pinkier I, Rutkowska L, Chlebna-Sokół D, Jakubowska-Pietkiewicz E, Michałus I, et al. 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) 12:692978. doi: 10.3389/fgene.2021.692978
- Sałacińska K, Michałus I, Pinkier I, Rutkowska L, Chlebna-Sokół D, Jakubowska-Pietkiewicz E, et al. The first glycine-to-tryptophan substitution in the COL1A1 gene identified in a patient with progressively-deforming Osteogenesis imperfecta. *Mol Genet Genomic Med* (2022) 10(8):e1996. doi: 10.1002/mgg3.1996
- Forlino A, Keene DR, Schmidt K, Marini JC. An alpha2(I) glycine to aspartate substitution is responsible for the presence of a kink in type I collagen in a lethal case of osteogenesis imperfecta. *Matrix Biol* (1998) 17(8-9):575–84. doi: 10.1016/S0945-053X(98)90109-3
- Zhytnik I, Maasalu K, Pashenko A, Khmyzov S, Reimann E, Prans E, et al. COL1A1/2 pathogenic variants and phenotype characteristics in ukrainian osteogenesis imperfecta patients. *Front Genet* (2019) 10:722. doi: 10.3389/fgene.2019.00722

Funding

Research was funded by Polish Mother's Memorial Hospital Research Institute, grant number 2016/IV/57-MN, and OPUS National Science Centre Poland, grant number 2014/13/B/NZ5/03102.

Acknowledgments

We thank patients and their families for participation in this study.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2023.1149982/full#supplementary-material>

13. Cole WG, Dalgleish R. Perinatal lethal osteogenesis imperfecta. *J Med Genet* (1995) 32(4):284–9. doi: 10.1136/jmg.32.4.284
14. OIVD database.
15. Rusińska A, Jakubowska-Pietkiewicz E, Michałus I, Kurnatowska O, Rychłowska E, Beska K, et al. Diversity of clinical symptoms of osteogenesis imperfecta in children – diagnostic difficulties based on own experience. *Post N Med* (2016), 716–22. doi: 10.5604/08606196.1222458
16. Maioli M, Gnoli M, Boarini M, Tremosini M, Zambrano A, Pedrini E, et al. Genotype-phenotype correlation study in 364 osteogenesis imperfecta Italian patients. *Eur J Hum Genet* (2019) 27(7):1090–100. doi: 10.1038/s41431-019-0373-x
17. Lindahl K, Åström E, Rubin CJ, Grigelioniene G, Malmgren B, Ljunggren Ö, et al. Genetic epidemiology, prevalence, and genotype-phenotype correlations in the Swedish population with osteogenesis imperfecta. *Eur J Hum Genet* (2015) 23(8):1112. doi: 10.1038/ejhg.2015.129
18. Hartikka H, Kuurila K, Kärkkö J, Kaitila I, Grénman R, Pynnönen S, et al. Lack of correlation between the type of COL1A1 or COL1A2 mutation and hearing loss in osteogenesis imperfecta patients. *Hum Mutat* (2004) 24(2):147–54. doi: 10.1002/humu.20071
19. Zhytnik L, Maasalu K, Reimann E, Prans E, Köks S, Märtson A. Mutational analysis of COL1A1 and COL1A2 genes among Estonian osteogenesis imperfecta patients. *Hum Genomics* (2017) 11(1):19. doi: 10.1186/s40246-017-0115-5
20. Dalgleish R. III: Clinical and molecular genetics of Osteogenesis imperfecta, Chapter 10: Osteogenesis Imperfecta Genotypes and Genotype-Phenotype Relationships. In: Shapir J, Byers PH, Glorieux FH, Sponseller PD, editors. *Osteogenesis imperfecta - A translational approach to brittle bone disease*. Elsevier Inc (2014). p. 103–10. doi: 10.1016/B978-0-12-397165-4.00010-1
21. Marini JC, Blissett AR. New genes in bone development: what's new in osteogenesis imperfecta. *J Clin Endocrinol Metab* (2013) 98(8):3095–103. doi: 10.1210/jc.2013-1505
22. Schleit J, Bailey SS, Tran T, Chen D, Stowers S, Schwarze U, et al. Molecular outcome, prediction, and clinical consequences of splice variants in COL1A1, which encodes the $\alpha 1(I)$ chains of type I procollagen. *Hum Mutat* (2015) 36(7):728–39. doi: 10.1002/humu.22812
23. Bodian DL, Madhan B, Brodsky B, Klein TE. Predicting the clinical lethality of osteogenesis imperfecta from collagen glycine mutations. *Biochemistry* (2008) 47(19):5424–32. doi: 10.1021/bi800026k
24. Byers PH, Wallis GA, Willing MC. Osteogenesis imperfecta: translation of mutation to phenotype. *J Med Genet* (1991) 28(7):433–42. doi: 10.1136/jmg.28.7.433
25. Bodian DL, Chan TF, Poon A, Schwarze U, Yang K, Byers PH, et al. Mutation and polymorphism spectrum in osteogenesis imperfecta type II: implications for genotype-phenotype relationships. *Hum Mol Genet* (2009) 18(3):463–71. doi: 10.1093/hmg/ddn374
26. Symoens S, Hulmes DJ, Bourhis JM, Coucke PJ, De Paep A, Malfait F. Type I procollagen C-propeptide defects: study of genotype-phenotype correlation and predictive role of crystal structure. *Hum Mutat* (2014) 35(11):1330–41. doi: 10.1002/humu.22677
27. Marini JC, Forlino A, Cabral WA, Barnes AM, San Antonio JD, Milgrom S, et al. Consortium for osteogenesis imperfecta mutations in the helical domain of type I collagen: regions rich in lethal mutations align with collagen binding sites for integrins and proteoglycans. *Hum Mutat* (2007) 28(3):209–21. doi: 10.1002/humu.20429
28. Ben Amor IM, Glorieux FH, Rauch F. Genotype-phenotype correlations in autosomal dominant osteogenesis imperfecta. *J Osteoporos*. (2011) 2011:540178. doi: 10.4061/2011/540178
29. Pepin MG, Byers PH. What every clinical geneticist should know about testing for osteogenesis imperfecta in suspected child abuse cases. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* (2015) 169(4):307–13. doi: 10.1002/ajmg.c.31459



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

OPEN ACCESS

Edited by:
Enrico Baruffini,
University of Parma, Italy

Reviewed by:
Gerard Pals,
Amsterdam University Medical
Center, Netherlands
Aideen McInerney-Leo,
The University of Queensland,
Australia
Sulev Kõks,
University of Tartu, Estonia

***Correspondence:**
Kinga Salacińska
kinga.salacinska@iczm.p.edu.pl

Specialty section:
This article was submitted to
Genetics of Common and Rare
Diseases,
a section of the journal
Frontiers in Genetics

Received: 09 April 2021

Accepted: 07 June 2021

Published: 09 July 2021

Citation:
Salacińska K, Pinkier I,
Rutkowska L, Chlebna-Sokół D,
Jakubowska-Pietkiewicz E, Michalus I,
Kępczyński Ł, Salachna D,
Jamsheer A, Bukowska-Olech E,
Jaszczyk I, Jakubowski L and Gach A
(2021) 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. 12:692978.
doi: 10.3389/fgene.2021.692978

Kinga Salacińska^{1*}, Iwona Pinkier¹, Lena Rutkowska¹, Danuta Chlebna-Sokół²,
Elżbieta Jakubowska-Pietkiewicz³, Izabela Michalus³, Łukasz Kępczyński¹,
Dominik Salachna¹, Aleksander Jamsheer^{4,5}, Ewelina Bukowska-Olech⁴,
Ilona Jaszczyk⁶, Lucjusz Jakubowski¹ and Agnieszka Gach¹

¹ Department of Genetics, Polish Mother's Memorial Hospital Research Institute, Łódź, Poland, ² Department of Bone Metabolic Diseases, University Centre of Paediatric, Medical University of Łódź, Łódź, Poland, ³ Department of Paediatric Propedeutics and Bone Metabolic Diseases, Medical University of Łódź, Łódź, Poland, ⁴ Department of Medical Genetics, Poznań University of Medical Sciences, Poznań, Poland, ⁵ Centers for Medical Genetics GENESIS, Poznań, Poland, ⁶ Department of Cancer Genetics with Cytogenetics, Medical University of Lublin, Lublin, Poland

Osteogenesis imperfecta (OI) is a rare genetic disorder demonstrating considerable phenotypic and genetic heterogeneity. The extensively studied genotype–phenotype correlation is a crucial issue for a reliable counseling, as the disease is recognized at increasingly earlier stages of life, including prenatal period. Based on population studies, clusters in *COL1A1* and *COL1A2* genes associated with the presence of glycine substitutions leading to fatal outcome have been distinguished and named as “lethal regions.” Their localization corresponds to the ligand-binding sites responsible for extracellular interactions of collagen molecules, which could explain high mortality associated with mutations mapping to these regions. Although a number of non-lethal cases have been identified from the variants located in lethal clusters, the mortality rate of mutations has not been updated. An next generation sequencing analysis, using a custom gene panel of known and candidate OI genes, was performed on a group of 166 OI patients and revealed seven individuals with a causative mutations located in the lethal regions. Patients' age, ranging between 3 and 25 years, excluded the expected fatal outcome. The identification of non-lethal cases caused by mutations located in lethal domains prompted us to determine the actual mortality caused by glycine substitutions mapping to lethal clusters and evaluate the distribution of all lethal glycine mutations across collagen type I genes, based on records deposited in the OI Variant Database. Finally, we identified six glycine substitutions located in lethal regions of *COL1A1* and *COL1A2* genes, of which four are novel. The review of all mutations in the dedicated OI database, revealed 33 distinct glycine substitutions in two lethal domains of *COL1A1*, 26 of which have been associated with a fatal outcome. Similarly,

109 glycine substitutions have been identified in eight lethal clusters of *COL1A2*, of which 51 have been associated with a fatal manifestation. An analysis of all glycine substitutions leading to fatal phenotype, showed that their distribution along collagen type I genes is not regular, with 17% (26 out of 154) of mutations reported in *COL1A1* and 64% (51 out of 80) in *COL1A2* corresponding to localization of the lethal regions.

Keywords: osteogenesis imperfecta, *COL1A1*, *COL1A2*, genotype–phenotype correlation, next generation sequencing, fractures, collagen type I, genetic background

INTRODUCTION

Osteogenesis imperfecta (OI) is a rare connective tissue disorder with considerable clinical and genetic heterogeneity. The extensively studied genotype–phenotype correlation is a crucial issue for a reliable counseling, as with the advances in ultrasound scans the disease is increasingly recognized at prenatal period. The mechanism of pathogenesis is predominantly linked with the *COL1A1* and *COL1A2* genes, whose mutations result in quantitative or qualitative defects of collagen alpha(I) chains (Kang et al., 2017; Robinson and Rauch, 2019; Steiner and Basel, 2019). Alterations of collagen type I molecules affect a number of tissues, such as bone, ligament, and tendon, as well as cartilage, dermis, dentine, sclera, and cornea, resulting in various skeletal and extra-skeletal manifestations. The most characteristic features of OI are multiple low-energy fractures, short stature, long bones and chest deformations, triangular-shaped face, blue sclera, abnormalities of the dentin (Dentinogenesis imperfecta, DI), hearing impairment, and joint hypermobility.

Depending on clinical spectrum and severity, four basic OI types ranging from mild to perinatal lethal have been originally distinguished. They are all associated with mutations in the *COL1A1* and *COL1A2* genes. Type I is the mildest form of the disease. Patients are characterized by normal or nearly normal height, blue sclera, joint hypermobility, and hearing impairment, which occurs in adulthood. Increased susceptibility to fractures, not resulting in bone deformations, often occurs at birth or when the child begins to walk, but decreases after puberty. Type II is the most severe form, characterized by multiple *in utero* fractures, shortened and bowed limbs, flexed and abducted hips, a small chest with beaded ribs, hypoplastic face, large and soft calvarium, deep blue sclera, and osteopenia. Due to numerous skeletal deformations, the majority of children with type II are stillborn or die in the perinatal period because of respiratory problems. Type III, or progressively deforming, is the most severe non-lethal form of OI apparent from birth. The majority of patients have to use a wheelchair due to severe bone fragility, a barrel-shaped chest, and deformations of the long bones. Facial dysmorphism, marked short stature, and basilar impression are commonly observed. Type IV is a moderate form, with clinical features demonstrating severity between mild type I and progressively deforming type III (Cole and Dalgleish, 1995; Basel and Steiner, 2009). Current nosology distinguishes additional fifth OI type presenting hyperostosis, mapping to *IFITM5* gene. The

suggested subdivision corresponds to the severity of symptoms, based on clinical and radiological features, without taking into account the genetic background (Mortier et al., 2019). On the contrary, the Online Mendelian Inheritance in Men database distinguishes XXI types of OI, where types VI–XXI result from pathogenic variants located in distinct non-collagen genes, however, presenting clinical features overlapping with type II, III, and IV (Van Dijk and Sillence, 2014; Trejo and Rauch, 2016; Online Mendelian Inheritance in Men (OMIM), 2021).

Nowadays, it is possible to identify fractures and bone deformations suggesting metabolic bone disorder (e.g., OI, hypophosphatasia, thanatophoric dysplasia, campomelic dysplasia, and achondrogenesis), using ultrasound examination in the prenatal period. In case of OI, the lethal type II can be detected at 13–14 weeks of gestation, progressively deforming type III at 17–18 weeks, and mild type I later in pregnancy, when fractures or bowed femurs occur. Molecular testing can also be performed to identify the genetic cause in the fetus; this can be used to verify the primary diagnosis and even distinguish classic non-deforming OI from other types. Thus, ultrasound examination supported by DNA analysis may impact perinatal care and even influence the decision to continue the pregnancy, in the case of severe OI type II (Steiner and Basel, 2019; Online Mendelian Inheritance in Men (OMIM), 2021).

In recent years molecular testing has allowed growing numbers of individuals to be identified with causative mutations, thus enabling the determination of particular genetic factors and its potential severity. It is believed that the final clinical outcome is influenced by the gene in which the mutation is located, the type of mutation, its position in the alpha(I) chain and the particular amino acid substituting for glycine (Byers et al., 1991; Cole and Dalgleish, 1995; Bodian et al., 2008; Basel and Steiner, 2009; Marini et al., 2012; Kang et al., 2017).

Early genotype–phenotype analysis of perinatal lethal OI highlighted the absence of lethal mutation hot-spots in either the *COL1A1* or *COL1A2* gene, as the majority of mutations reported in unrelated babies were “private” and occurred *de novo*. Type II was reported to result from structural mutations, of which two-thirds were found in the alpha(I) chain, with the preferred location toward the carboxyl-terminal end (Cole and Dalgleish, 1995). The first reports about regions containing high concentrations of lethal mutations was mentioned by Marini et al. (1993) and Wang et al. (1993). Their observations revealed an alternating occurrence of clusters containing lethal and non-lethal glycine substitutions along the gene, with three such regions present in *COL1A1* and two in *COL1A2*. This discovery indicated that the clinical severity of OI is not only determined

Abbreviations: OI, Osteogenesis imperfecta; DI, Dentinogenesis imperfecta; MLBR, Major Ligand-Binding Regions; NGS, Next Generation Sequencing; OI-V, Osteogenesis imperfecta Variant Database.

by the impact of the mutation on the structure or assembly of the monomer, but may also play a role in higher order interactions with multiple matrix molecules (Di Lullo et al., 2002; Sweeney et al., 2008).

The mapping of the collagen type I protein revealed three Major Ligand Binding Regions (MLBR) and various functional domains in the collagen type I genes (Di Lullo et al., 2002). Although three such regions were distinguished, a strong relationship was observed between the localization of lethal mutations with MLBR1 and MLBR2 of the $\alpha 1(I)$ chain (Sweeney et al., 2008; Marini et al., 2012).

In 2007, based on an analysis of over 800 mutations leading to OI type II, III, and IV, Marini et al. distinguished two stretches of glycine substitutions resulting in almost exclusively lethal outcomes at helical positions 691–823 and 910–964 in the $\alpha 1(I)$ chain, referring to the localization of second and third major ligand-binding region, respectively. In the collagen $\alpha 2(I)$ chain, eight regularly spaced clusters containing lethal mutations were described. They are concentrated in two-thirds of the chain and correspond to regions that play crucial roles in the interactions between collagen fibrils and proteoglycans (Marini et al., 2012). The impact of MLBRs on the final clinical outcome of mutations was also highlighted by Bodian et al. (2008).

Since the lethal regions were distinguished, the database of OI mutations has significantly expanded. A number of cases have been revealed that question whether mutations mapping to ligand-binding sites are always fatal (Pollitt et al., 2006; Bodian et al., 2009; Rauch et al., 2010; Reuter et al., 2013; Lindahl et al., 2015; Maasalu et al., 2015; Hruskova et al., 2016; Zhytnik et al., 2017, 2019; Maioli et al., 2019). Unfortunately, most of our knowledge about these special gene regions is still based on the primary findings obtained in 2007, as well as some review articles, individual publications, and separate records from the dedicated Osteogenesis Imperfecta Variant Database (OIVD; Bodian et al., 2009; Rauch et al., 2010; Mouna Ben Amor et al., 2011; Forlino et al., 2012; Marini and Blissett, 2013; Reuter et al., 2013; Maasalu et al., 2015; Forlino and Marini, 2016; Kang et al., 2017; Marini et al., 2017; Maioli et al., 2019; Osteogenesis Imperfecta Variant Database, 2020). Although multiple sources refer to lethal regions, no overall summary of related mortality is currently available. More importantly, due to the continuous expansion of the OI mutation database, the lethal regions require constant review.

The present paper is a fragment of a population-based study analyzing genetic background of OI in a Polish population using custom gene panel for next generation sequencing (NGS). Among 166 recruited individuals, we have identified a group of seven patients with causative mutations situated in the lethal regions of collagen type I genes. Despite variants location, patients presented mild, moderate, and progressively deforming OI phenotypes. Proband was found to carry one out of six glycine substitutions, of which four are novel and two has been described previously (Figure 1). The identification of mutations causing a non-lethal phenotypes placed in this specific regions prompted us to investigate the OIVD to determine what proportion of glycine substitutions within lethal domains of *COL1A1* and *COL1A2* are actually associated with a fatal

outcome. The results were expanded by a short analysis of all glycine substitutions leading to lethal phenotype and their distribution along collagen type I genes regarding lethal regions.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

In the present paper, we describe in detail seven patients with a causative variants located in the lethal regions of collagen type I genes. Individuals were of Caucasian origin, and aged 3–25 years. Proband was identified as part of a population-based study, which included 166 patients presenting with a broad clinical manifestation of OI. The group was recruited by six Polish medical health centers. The study was approved by the local Ethics Committee. Informed consent was obtained from patients and legal guardians of children below 14 years old before the study. Clinical characteristics were derived from medical records by retrospective chart review.

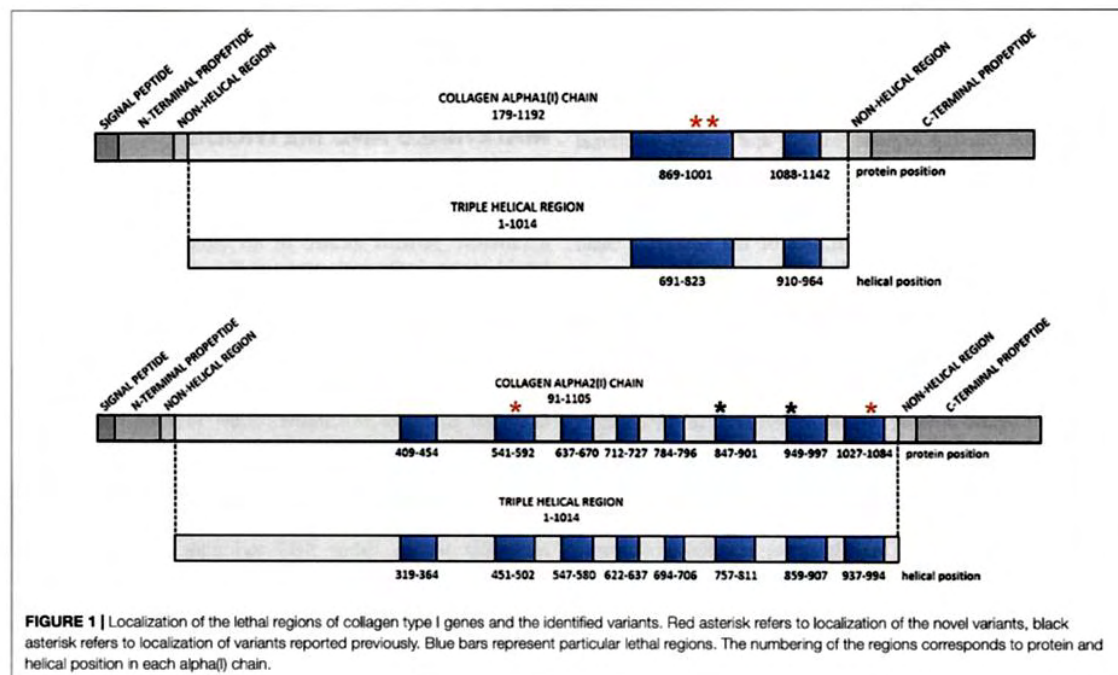
Next Generation Sequencing

Molecular testing using NGS technique was performed in the entire study group. Genomic DNA was automatically extracted from peripheral blood leukocytes using a MagCore Genomic DNA Whole Blood Kit (RBC Bioscience, Taiwan). The pathogenic variants were detected using a custom gene panel containing OI and OI-related genes (*COL1A1*, *COL1A2*, *IFITM5*, *SERPINF1*, *CRTAP*, *P3H1*, *PPIB*, *SERPINH1*, *FKBP10*, *SP7*, *BMP1*, *TMEM38B*, *WNT1*, *CREB3L1*, *SPARC*, *PLS3*, *SEC24D*, *P4HB*, *PLOD2*, *TNFSF11*, *LRP5*, *DKK1*, *RANKL*, *XYLT2*, *BMP2*, *BMP3*, *BMP4*, *BMP5*, *BMP6*, *BMP7*, *OPG*, *SOST*, *IL6*, and *IGF1*) for resequencing the exons and flanking non-coding sequences (Illumina Design Studio software). The gene panel, composed of 710 amplicons with a mean length of 175 bp, reached 99% coverage. TruSeq Custom Amplicon libraries were prepared according to the manufacturer's protocol and sequenced on the MiniSeq platform (Illumina, United States) using two types of cartridge (Mid Output and High Output Kit, 300 cycles; Illumina, United States).

Variant Identification, Classification, and Validation

The six described variants were identified through a multi-step bioinformatic process. The primary analysis was performed using Illumina VariantStudio software according to the GenBank human reference cDNA sequence for the *COL1A1* (NM_000088.3) and *COL1A2* (NM_000089.3) genes (GRCh37). Variant filtering and prioritization was performed using the Varsome variant interpretation tool¹ according to the population frequency value for the European non-Finnish population (<2%) and several prediction programs. Additionally, variants were checked in public databases (dbSNP, gnomAD Exomes, gnomAD Genomes, ClinVar, HGMD, OIVD – part of LOVD) and available literature. Multiple Sequence Alignment analysis, using Clustal Omega 1.2.4 and Jalview 2.11.0 software, was

¹<https://varsome.com/>



performed to generate alignments between multiple sequences and analyze the conservation score of novel variants across species. Finally, the mutations were classified according to ACMG recommendations.

Any pathogenic, likely pathogenic or variants of unknown significance were selected and validated by Sanger sequencing. Custom primers were designed for regions containing the selected mutations. The PCR products were cleaned (ExoSAP-IT; Applied Biosystems, United States), labeled (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems, United States), and sequenced using a 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, United States). The obtained data was analyzed using Mutation Surveyor V5.1.0 software (SoftGenetics, United States).

Review of all Reported Glycine Substitutions in Lethal Regions of *COL1A1* and *COL1A2* Genes

Based on the discovery of variants located within lethal regions resulting in non-lethal phenotypes, we examined over three thousand records collected in 2020 in the open online OIVD² to prepare two data-analysis.

The first, concerned the clinical severity of all glycine substitutions mapping to two lethal regions of the *COL1A1* gene and eight regions of the *COL1A2* gene (according to the localization described by Marini et al.), to evaluate what proportion of glycine substitutions within lethal domains is

actually associated with a fatal outcome. The second analysis referred to all glycine substitutions associated with a lethal form of OI reported in the collagen type I genes. Their characteristics and distribution along *COL1A1* and *COL1A2* was performed to better understand the impact of lethal regions on clinical severity of mutations.

All calculations were carried out according to the protein position of the variants. If the mutation was reported to cause more than one type of OI, each clinical outcome of a particular mutation was counted as a separate variant. As the mortality of the lethal regions is predominantly linked with missense mutations, only glycine substitutions with a confirmed pathogenic status and a described OI type (I–IV) were analyzed.

RESULTS

In the tested cohort seven individuals presenting non-lethal OI phenotypes despite harboring a glycine substitution within lethal region of collagen type I genes were identified. Among six distinct variants, four are reported for the first time. The identification of non-lethal cases caused by mutations located in regions expected to result in the most severe form of OI, prompted us to investigate the dedicated OIVD. Data analysis of the deposited records was performed to determine the actual mortality of glycine substitutions mapping to these special gene regions and to investigate distribution and characteristics of all amino acids substituting for glycine in the entire *COL1A1* and *COL1A2* genes.

²<https://oi.gene.le.ac.uk/home.php>

Detailed information are provided in the corresponding sections, summarized in tables and presented in figures.

Clinical Presentation of the Positive Cases

In the study population of 166 Polish patients suspected with OI, seven individuals were found to carry pathogenic glycine substitutions located within lethal regions of the collagen type I genes. The age of the patients, ranging between 3 and 25 years old, excluded the expected lethal outcome associated with localization of the causative variant. The individuals were diagnosed with mild OI type I, moderately deforming type IV or progressively deforming type III, and presented a broad spectrum of clinical features. The patients' phenotype is summarized in **Table 1**.

Patient 1 is a 6-year-old girl, a second child of non-consanguineous parents, with features of OI noticeable after week 20 of pregnancy. After birth, the patient presented severe craniofacial dysmorphism and blue sclera. Shortened extremities, reduced muscle tone, and signs of numerous *in utero* fractures were observed. Further examination showed chest distortion, flattened vertebrae, delayed psycho-motor development, DI, and hearing impairment. After treatment with bisphosphonates initiated at week 3 of life, no further fractures were reported. A new c.2984G>C (p.Gly995Ala) mutation was identified in *COL1A1* gene in the girl. No such variant was observed in either parent by NGS or by targeted Sanger sequencing. However, targeted Sanger sequencing confirmed its presence in a biobanked blood sample from a deceased older brother. The first child, with perinatal fractures, circulatory difficulties, and severe phenotype, died at the age of 6 months. Due to observed recurrence, we suspect germinal mosaicism in one of the parents.

Patient 2 is a 7-year-old girl, initially diagnosed with thanatophoric dysplasia with multiple bone defects observed in USG performed at week 21 of pregnancy. The ultrasound image revealed signs of perinatal fractures, poor skeleton mineralization, irregular width of ribs, shortened, and bent extremities, which changed the diagnosis to OI type IIB. Multiple facial deformities and features of DI were observed. The patient sustained about 20 fractures following birth. At the age of 3½ years, she was not able to walk independently: she is currently using a wheelchair. Treatment with bisphosphonates started at week 7 of life. Since then, two fractures have been reported. NGS sequencing revealed a novel c.2993G>C (p.Gly998Ala) mutation in the *COL1A1* gene. Family screening performed in parents excluded the presence of the variant.

Patient 3 is a 25-year-old female diagnosed with OI type III with weight and body height deficiency, both below third centile. She has sustained about 20 fractures and is currently using a wheelchair. She presents features characteristic of the progressively deforming type, including shortening of lower extremities, barrel-shaped chest, disproportionately large head, triangular-shaped face, blue sclera, and DI. Pamidronate treatment started at the age of 15 years. The patient was found to harbor a novel c.1667G>T (p.Gly556Val) mutation in the *COL1A2* gene. The patient has a negative family history and healthy siblings. The mutation was not found in the mother by

TABLE 1 | Clinical characteristics of patients reported in the study.

Patients number	Age	Height (centile)	Prenatal fractures	Number of fractures	BS	DI	Hearing impairment	Long bone deformation	Face dysmorphism	Inheritance	Mobility	Bisphosphonate treatment	OI type
1.	6	<3	Yes	Unknown	Yes	Yes	Suspected	Yes	Yes	Suspected parental mosaicism	Delayed	Yes	III
2.	7	<3	Yes	22	No	Yes	No	Yes	Yes	De novo	Wheelchair	Yes	III
3.	25	<3	Yes	20	Yes	Yes	No	Yes	Yes	De novo	Wheelchair	Yes	III
4.	23	<3	No	12	No	No	No	Yes	No	Suspected de novo	Clubfeet	Yes	IV
5.	3	<3	Yes	12	Yes	No	No	Yes	Yes	De novo	Impeded	Yes	III
6.	9	<3	Yes	10	No	No	No	Yes	Yes	Suspected De novo	Wheelchair	Yes	III
7.	18	25–50	No	7	Yes	No	No	No	No	De novo	Proper	No	I

Abbreviation BS refers to blue sclera, DI to Dentinogenesis imperfecta.

Sanger sequencing; however, as no DNA sample was available from the father, we can only suspect the *de novo* appearance of the mutation.

Patient 4 is a 23-year-old man with 12 reported fractures, with the first affecting the clavicle, observed at day 6 of life. Later fractures involved the femur, phalanx, and vertebrae. OI diagnosis was confirmed after a histopathologic test at the age of 4 years. Despite receiving several surgical interventions, the patient suffers from biconcave vertebral deformations due to height reduction in the lumbar spine, and demonstrates an abnormal posture, round back, and asymmetry of the scapulae. The patient suffers from lower limb asymmetry, valgus knee and flat lopsided feet, and demonstrates a disturbed gait. Pamidronate treatment performed at the age of 12–16 equalized mineral bone density level and possibly reduced the number of fractures. A previously reported c.2539G>A (p.Gly847Ser) mutation was found to be present in the *COL1A2* gene. Segregation analysis was not performed in patient's parents.

Patient 5 is a 3-year-old girl with severe bone deformations detected by prenatal ultrasound at week 21 of gestation, suggesting lethal OI type II. The girl was found to have 11 intrauterine fractures of the extremities and ribs. Only one postnatal fracture was reported as pamidronate treatment was included in the neonatal period. After birth, a triangular-shaped face, soft skull bones, frontal bossing, blue sclera, upper and lower bone shortening, and deformities were observed. The patient harbors a known mutation c.2845G>A (p.Gly949Ser) in the *COL1A2* gene. Family diagnostics excluded the presence of the mutation in parents.

Patient 6 is a 9-year-old girl. Pamidronate treatment was introduced during week 3 after birth. She has experienced 10 postnatal fractures of upper and lower limbs, as well as prenatal fractures of the femurs. The patient uses a wheelchair. She presents with a barrel-shaped chest and spinal defects, as well as shortening and bowing of limbs. Features characteristic for OI, such as skull deformations like triangular shape and frontal bossing, were observed. A c.2845G>A (p.Gly949Ser) mutation was found in the *COL1A2* gene, as in **Patient 5**, although the two probands are unrelated. Family history for OI is negative, parents were not tested as they were unavailable for family screening.

Patient 7 is an 18-year-old man, presenting skeletal deformities such as a barrel-shaped chest, asymmetry of shoulders and scapulae, kyphosis, and disproportionate stature. Other extra-skeletal features like blue sclera, astigmatism, and joint hypermobility are also observed. The patient has suffered seven fractures of the upper and lower limbs and one vertebral fracture. Bone mineral density and Z-score values are below reference levels. Treatment with bisphosphonates was proposed. A novel c.3215G>T (p.Gly1072Val) mutation was identified in the *COL1A2* gene. The mutation was not observed in the parents, confirming the *de novo* appearance of the variant.

Characteristics and Classification of the Identified Variants

A total of six distinct glycine substitutions located in the lethal regions of collagen type I genes were identified. Two

variants located in lethal cluster 1 of the *COL1A1* gene resulted in glycine-to-alanine substitutions (p.Gly995Ala, p.Gly998Ala). In the *COL1A2* gene, pathogenic variants were identified in four out of eight lethal domains, resulting in glycine-to-serine (p.Gly847Ser, p.Gly949Ser) and glycine-to-valine (p.Gly556Val, p.Gly1072Val) substitutions.

According to the OIVD, two variants have been previously reported. The first variant p.Gly847Ser, located in lethal region 6, has been identified in three independent studies in patients classified with mild type I and moderate type IV. The second substitution p.Gly949Ser, located in lethal region 7, has been reported in nine patients, with lethal type II, borderline type II/III, and progressively deforming type III.

The remaining four variants are reported for the first time. Two glycine-to-alanine mutations (p.Gly995Ala and p.Gly998Ala) were identified in exon 41, corresponding to the first lethal region of the *COL1A1* gene. In the *COL1A2* gene, two glycine-to-valine substitutions were reported in exon 29 (p.Gly556Val) and exon 48 (p.Gly1072Val); these correspond to the second and eighth lethal region, respectively. None of these variants has been reported in any human control or mutation database, including dbSNP, HGDM, ClinVar, or dedicated OIVD. No mutations have been found in the gnomAD Exomes (reaching good gnomAD Exome coverage, ranging from 69.9 to 82.5) or in gnomAD Genomes (reaching good gnomAD Genome coverage, ranging from 30.1 to 31.2). For all four variants, a deleterious effect on the gene or gene product was indicated by multiple lines of computational evidence of at least 10 pathogenic predictions (Varsome interpretation tool). According to the Multiple Sequence Alignment analysis all novel variants reached the highest conservation score across several species (Jalview 2.11.0, Clustal Omega 1.2.4; **Figure 2**). Finally, three variants were classified as likely pathogenic and one as pathogenic according to the ACMG classification. All novel mutations were submitted to the ClinVar database and assigned with accession numbers described in **Table 2**. Sanger sequencing chromatograms of the six identified mutations are presented in **Figure 3**.

Review of all Glycine Substitutions Located Within Lethal Regions of *COL1A1* and *COL1A2* Genes

The review of all glycine substitutions mapping to the lethal clusters was prepared according to the records deposited in the dedicated OIVD. A total of 33 unique glycine substitutions in 41 patients have been reported in the two lethal regions corresponding to the Major Ligand-Binding Regions in the *COL1A1* gene. However, two variants resulted in at least two different OI types, expanding the number of mutations to 36 distinct clinical outcomes. In addition, 109 distinct glycine substitutions in 162 patients have been reported in the eight lethal regions identified in the *COL1A2* gene. Of all mutations, 15 resulted in at least two different OI types, increasing the number of phenotype-dependent variants to 126.

Of the 36 distinct clinical outcomes of glycine substitutions reported in two lethal regions of *COL1A1* gene, 26 mutations (71%) resulted in a fatal outcome. Remaining mutations

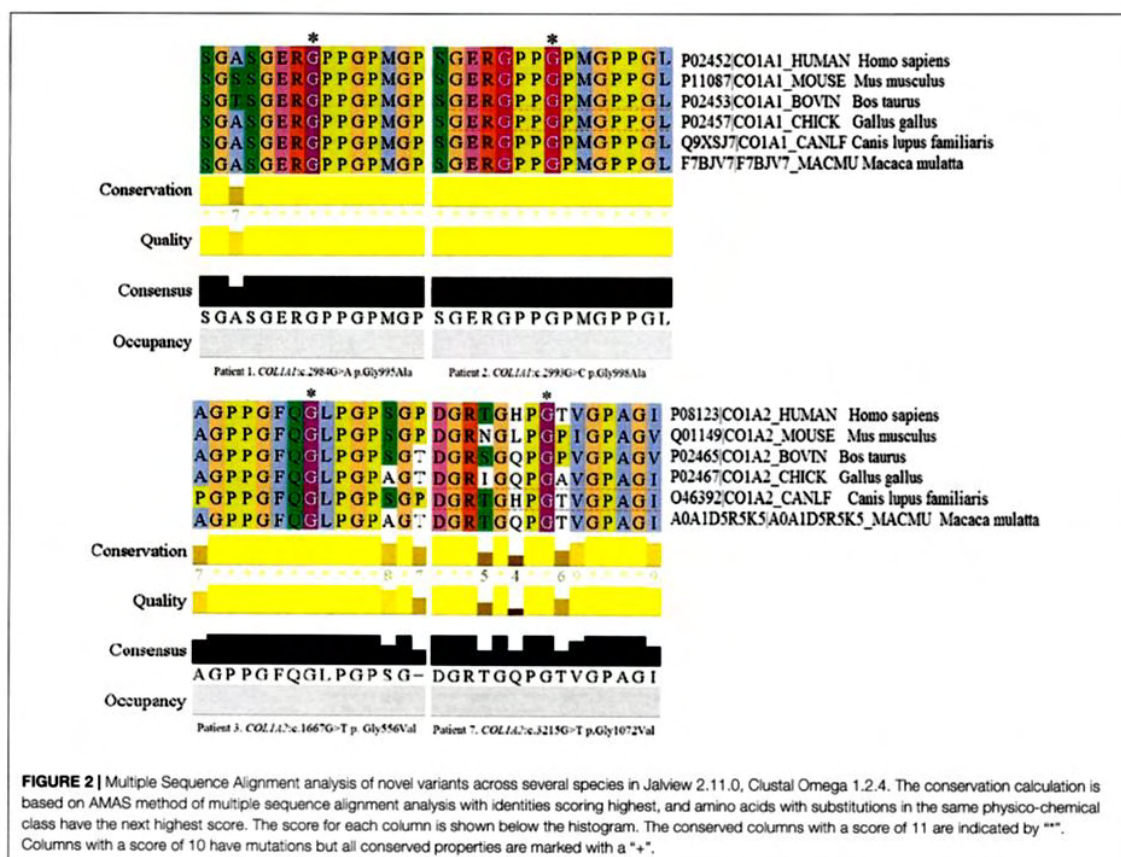


TABLE 2 | Variants reported in the study.

Nucleotide position	Protein position (helical position)	Effect	Localization	Lethal region	Novel mutation	Accession number	Patients number	OI type
COL1A1								
c.2984G>C	p.Gly995Ala (p.Gly817Ala)	Missense	exon 41	1	Yes	SCV000994662.1 (rs1598288656)	1	III
c.2993G>C	p.Gly998Ala (p.Gly820Ala)	Missense	exon 41	1	Yes	SCV000994663.1 (rs1598288634)	2	III
COL1A2								
c.1667G>T	p.Gly556Val (p.Gly466Val)	Missense	exon 29	2	Yes	SCV000994680.1 (rs1584322737)	3	III
c.2539G>A	p.Gly847Ser (p.Gly757Ser)	Missense	exon 40	6	Reported 3 times*	—	4	IV
c.2845G>A	p.Gly949Ser (p.Gly859Ser)	Missense	exon 44	7	Reported 9 times*	—	5 and 6	III
c.3215G>T	p.Gly1072Val (p.Gly982Val)	Missense	exon 48	8	Yes	SCV000994676.1 (rs1584330959)	7	I

All variants were reported in a heterozygous state. *reported in Osteogenesis Imperfecta Variant Database (<https://oi.gene.le.ac.uk/>).

accounted for a non-lethal OI type III ($n = 4$), type IV ($n = 3$), type I ($n = 2$), and borderline type I/IV ($n = 1$; **Figure 4**). Although both regions presented a slightly different distribution of OI types, 70% of variants located in lethal region 1 (18 out of 25) and 72% in region 2 (8 out of 11) resulted in fatal form of the disease.

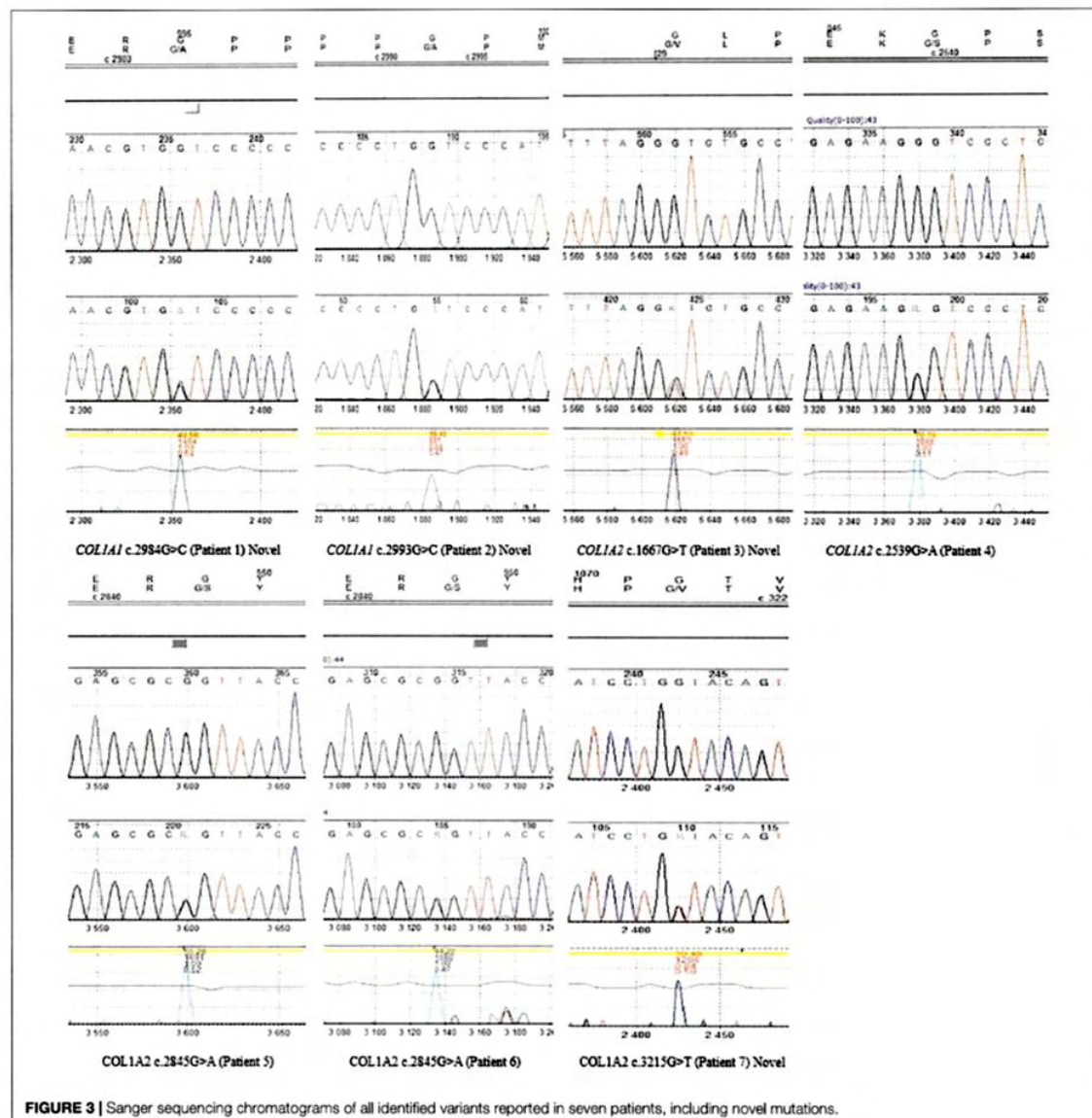
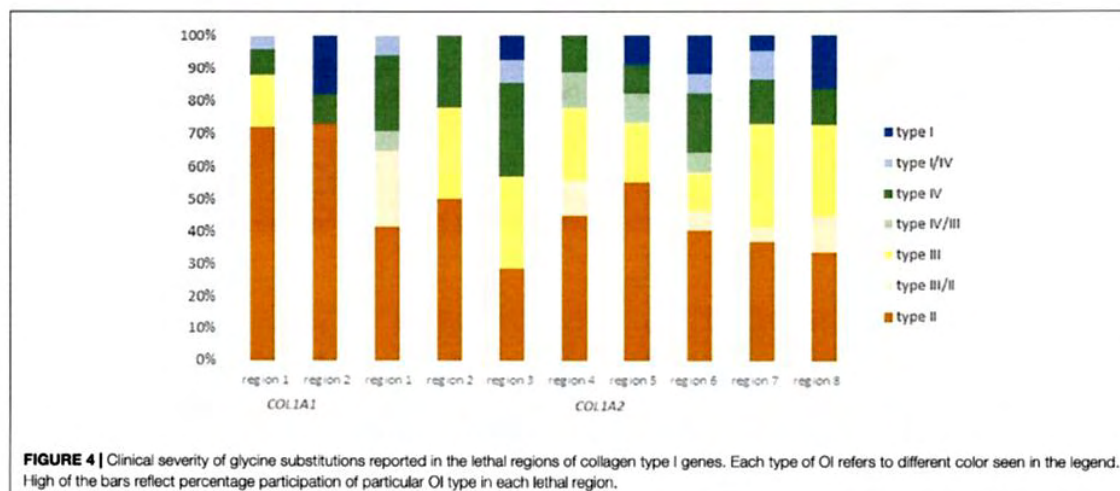


FIGURE 3 | Sanger sequencing chromatograms of all identified variants reported in seven patients, including novel mutations.

Seven amino acids have been found to substitute for glycine in lethal regions of the *COL1A1* gene. The occurrence and clinical severity of glycine residues varied between the two regions, with a total number of distinct mutations presented in the order: Ser ($n = 9$) > Ala ($n = 8$) > Asp, Cys ($n = 7$) > Glu, Val ($n = 2$) > Arg ($n = 1$). Each amino acid was responsible for at least one lethal case. The highest numbers of distinct OI type II mutations was reported in the following order: Ser ($n = 8$) > Cys ($n = 7$) > Asp ($n = 5$) > Ala, Val ($n = 2$) > Arg, Glu ($n = 1$; Table 3). Amino acids substituting for glycine have been associated with

different ratio of lethal and non-lethal mutations. For *COL1A1* gene, all substitutions by arginine, cysteine, and valine resulted in fatal outcome in both regions. Substitutions by serine and aspartic acid caused OI type II phenotype in over two-thirds of variants; glutamic acid in half of cases, and alanine residues in around a quarter.

Of the 126 phenotype-dependent glycine substitutions reported in eight lethal regions of *COL1A2* gene, 51 mutations (40%) resulted in fatal outcome. Non-lethal variants have been associated with OI type III ($n = 27$), type IV ($n = 22$), type II/III



($n = 9$), type I ($n = 8$), type I/IV ($n = 5$), and III/IV ($n = 4$; Figure 4). Similarly to the lethal domains of *COL1A1*, frequency of particular OI types varied between the eight regions. The number of lethal variants was ranging between four distinct mutations in region 3, to nine mutations in region 2. Majority of variants located in lethal domains resulted in fatal outcome, with the exception of cluster 3, in which equal numbers type II, III, and IV OI have been recognized. The highest proportion of 55% mutations causing OI type II was observed in region 5 (6 out of 11), while the lowest of 28% in region 3 (4 out of 14).

Eight amino acids substituting for glycine in lethal clusters of *COL1A2* gene presented differences in frequency, with a total number of distinct mutations descending in the order: Ser ($n = 38$) > Asp ($n = 32$) > Val ($n = 21$) > Arg, Cys ($n = 12$) > Glu ($n = 6$) > Ala ($n = 4$) > Phe ($n = 1$). Data analysis revealed variable clinical severity of glycine residues. Number of distinct variants leading to OI type II descends in the following order: Asp ($n = 18$) > Ser, Val ($n = 9$) > Cys ($n = 6$) > Arg ($n = 5$) > Glu ($n = 3$) > Phe ($n = 1$; Table 3). For *COL1A2* gene, phenylalanine reached the highest mortality, however, the substitution has been reported in a single case of lethal OI only. Aspartic acid, cysteine, glutamic acid, valine, and arginine substitutions resulted in nearly equal numbers of lethal and non-lethal phenotypes, while only one-quarter of serine substitutions resulted in a fatal outcome. All reported alanine substitutions have been non-lethal and resulted in OI type I ($n = 1$), IV ($n = 2$), and III ($n = 1$).

Review of all Glycine Substitutions Leading to Lethal Outcome and Their Distribution Along *COL1A1* and *COL1A2* Genes

The review of OIVD records showed that 34% of glycine substitutions (154 mutations) in *COL1A1* and 17% (80 mutations) in *COL1A2* resulted in OI type II. So far, lethal variants have been reported in 38 and 30 of out 52 exons

comprising *COL1A1* and *COL1A2* gene, respectively. Their distribution along alpha(I) chains is not regular, however, a marked increase of lethal mutations was observed from exon 17 toward the 3' end in both genes.

Lethal regions have been described according to the amino acid position. Although they are located within eight exons of *COL1A1* and nineteen of *COL1A2*, they do not always cover the entire exon. Compared to the length of helical domains of collagen type I genes, which are both 1,014 amino acids long, the two lethal clusters of the *COL1A1* gene comprise 186 amino acids (18%), while the eight clusters of *COL1A2* comprise 315 amino acids (31%).

In the *COL1A1* gene, the highest number of distinct glycine substitutions leading to a fatal outcome, was reported in exon 37 ($n = 15$), located right before lethal region 1 (MLBR2). Among the exons corresponding to lethal clusters, a maximum of six variants causing OI type II was found in exon 46 mapping entirely to lethal region 2 (MLBR3). In the *COL1A2* gene, the exons within the lethal domains demonstrated elevated numbers of lethal mutations. The highest number of distinct variants leading to a fatal outcome ($n = 6$) was reported in exon 39, belonging to the lethal cluster 5. Exons located outside the lethal regions have been associated with maximum of only three distinct lethal variants (Figure 5).

The frequency and severity of amino acids substituting for glycine shows variable pattern depending on gene in which mutation occurs. In the *COL1A1*, seven glycine residues have been reported to cause OI type II, with a number of distinct variants descending in the following order: Asp ($n = 34$) > Ser ($n = 31$) > Arg ($n = 29$) > Val ($n = 25$) > Cys ($n = 23$) > Glu ($n = 7$) > Ala ($n = 5$). Regarding proportion of lethal and non-lethal mutations valine, which is the only hydrophobic amino acid substituting for glycine in the *COL1A1* gene, presented the highest lethality, reaching 64% (25 out of 39 mutations). Residues with charged side chains (Asp, Glu, Arg) resulted in approximately equal numbers of lethal and non-lethal variants,

TABLE 3 | Summary of the effects of substitution for glycine in lethal regions of the COL1A1 and COL1A2 gene with the number of mutations resulting in each type of Osteogenesis imperfecta.

OI type/Amino acid	Ala	Arg	Asp	Cys	Glu	Ser	Val	Total	% participation of OI type	
COL1A1 gene										
I	1	–	–	–	1	–	–	2		6%
I/IV	1	–	–	–	–	–	–	1		3%
IV	3	–	–	–	–	–	–	3		8%
III/IV	–	–	–	–	–	–	–	0		0%
III	1	–	2	–	–	1	–	4		11%
II/III	–	–	–	–	–	–	–	0		0%
II	2	1	5	7	1	8	2	26		72%
Total	8	1	7	7	2	9	2	36		100%
Ratio of lethal vs non-lethal mutations	2:6	1:0	5:2	7:0	1:1	8:1	2:0	26:10		–
OI type/Amino acid	Ala	Arg	Asp	Cys	Glu	Ser	Val	Phe	Total	% participation of OI type
COL1A2 gene										
I	1	–	2	1	–	2	2	–	8	6,5%
I/IV	–	1	2	–	–	1	1	–	5	4%
IV	2	2	3	3	2	8	2	–	22	17,5%
III/IV	–	1	1	–	–	2	–	–	4	3%
III	1	3	4	2	–	12	5	–	27	21,5%
II/III	–	–	2	–	1	4	2	–	9	7%
II	–	5	18	6	3	9	9	1	51	40,5%
Total	4	12	32	12	6	38	21	1	126	100%
Ratio of lethal vs non-lethal mutations	0:4	5:7	18:14	6:6	3:3	9:29	9:12	1:0	51:75	–

The odds the mutations being lethal for each residue is given.

while small amino acids (Cys, Ser, Ala) resulted in fatal outcome in one-third of the mutations (Table 4).

In the COL1A2 gene, eight amino acids have been associated with OI type II. The number of distinct mutations resulting in a lethal phenotype is presented in the following order: Asp ($n = 25$) > Val ($n = 19$) > Ser ($n = 10$) > Glu ($n = 9$) > Arg ($n = 8$) > Cys ($n = 7$) > Leu, Phe ($n = 1$) > Ala ($n = 0$). According to the odds of lethal variants compared to the number of all mutations reported in the COL1A2 gene, hydrophobic amino acids (Leu, Phe) have been associated with fatal outcomes only; however, single variants have been reported. Mutations resulting from acidic charged (Glu, Asp) and hydrophobic (Val) residues have been lethal in one-quarter of substitutions. Small amino acids (Cys, Ser) and positively charged arginine resulted in a fatal manifestation in 15% of cases, while substitutions by alanine were only associated with non-lethal phenotypes (Table 4).

DISCUSSION

Lethal regions are special domains located in the collagen type I genes associated with the presence of glycine substitutions leading to the most severe, lethal form of OI. These special gene regions correspond to the localization of functional domains

responsible for intramolecular interactions of collagen molecules. In the population-based study of 166 individuals with OI, we identified six pathogenic variants located in the lethal regions of the COL1A1 and COL1A2 genes in seven patients presenting a non-lethal phenotypes. Of these mutations, four are reported for the first time.

Genotype–phenotype analysis, based on data available in the OIVD, revealed that clinical outcome of the identified novel variants corresponds to severity observed in similar cases. In lethal region 1 of the COL1A1 gene, two novel alanine substitutions (p.Gly995Ala and p.Gly998Ala) were identified in two patients classified with progressively deforming type III. From 23 distinct glycine substitutions reported in this region, only two were replaced by alanine: one resulted in moderate type IV, and the other with borderline type I/IV, moderate type IV, and progressively deforming type III (Osteogenesis Imperfecta Variant Database, 2020). In the COL1A2 gene, three patients were found to harbor a causative glycine-to-serine substitution (p.Gly847Ser and p.Gly949Ser). The first variant (p.Gly847Ser), located in lethal region 6, was identified in a single patient presenting a moderate phenotype. The mutation has previously been reported in three independent studies where patients were classified with OI type I and IV. Serine is the most common amino acid substituting for glycine in this region; most variants resulted in a moderate and mild outcomes, and only one lethal

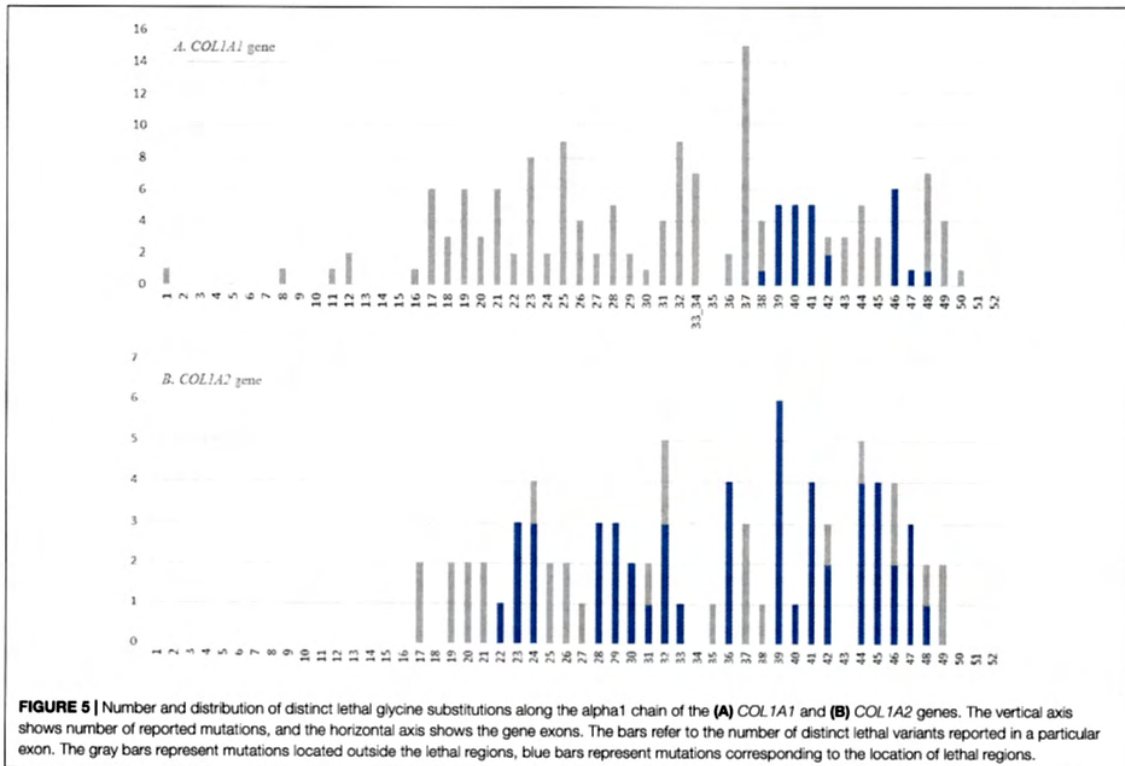


FIGURE 5 | Number and distribution of distinct lethal glycine substitutions along the alpha1 chain of the (A) COL1A1 and (B) COL1A2 genes. The vertical axis shows number of reported mutations, and the horizontal axis shows the gene exons. The bars refer to the number of distinct lethal variants reported in a particular exon. The gray bars represent mutations located outside the lethal regions, blue bars represent mutations corresponding to the location of lethal regions.

mutation has been reported (Osteogenesis Imperfecta Variant Database, 2020). The second serine substitution (p.Gly949Ser), located in lethal region 7, was identified in two unrelated patients, both diagnosed with progressively deforming type III. The variant has previously been reported in nine patients, with lethal type II, borderline type II/III, and progressively deforming type III (Osteogenesis Imperfecta Variant Database, 2020). In the study group, two individuals were found to harbor novel glycine to valine substitutions (p.Gly556Val and p.Gly1072Val); these were associated with the progressively deforming and mild forms of OI, respectively. The first variant (p.Gly556Val) was identified in lethal region 2, where only three valine substitutions have previously been reported: one was identified in a single patient with OI type III, while the other two resulted in OI type II in three patients (Osteogenesis Imperfecta Variant Database, 2020). The second mutation (p.Gly1072Val) was localized in lethal region 8. Similarly to region 2, only three valine substitutions have been reported; these resulted in single cases of mild type I, borderline type II/III, and lethal type II (Osteogenesis Imperfecta Variant Database, 2020).

The results of this primary analysis prompted us to perform a systematic review of all variants reported in the lethal regions to determine their actual mortality. At the time when these special gene domains were distinguished, glycine substitutions located in lethal clusters of the alpha1(I) chain were almost

exclusively fatal. In turn, 86% of mutations mapping to lethal regions of the alpha2(I) chain resulted in type II (Marini et al., 2012). Based on the current dataset of OI mutations, the mortality associated with variants located in the lethal regions reaches 72% for COL1A1 and 40% for COL1A2 (Osteogenesis Imperfecta Variant Database, 2020).

A short analysis of all glycine substitutions leading to OI type II and their distribution along collagen type I genes, revealed that lethal variants have been reported in more than a half of the exons comprising both collagen type I genes (Osteogenesis Imperfecta Variant Database, 2020). Interestingly a total of 26 (17%) fatal glycine substitutions located in COL1A1 and 51 (64%) in COL1A2, corresponds to location of the lethal regions. Thus for COL1A1 gene, a significant number of variants leading to a fatal outcome appears to be located outside lethal domains. It is possible that the structural aberrations situated before the ligand-binding regions may indirectly affect interactions between collagen and extracellular molecules. The small number of lethal variants found to be linked with lethal regions in the COL1A1 gene may be also due to the random occurrence of OI mutations and the fact that only 18% of the helical domain of the alpha1(I) chain is covered by lethal regions. Alternatively, there might be other factors influencing the high mortality in other parts of the COL1A1 gene. On the contrary, in the COL1A2 gene, a fatal outcome is more strongly linked with localization in

TABLE 4 | Summary of amino acids substituting for glycine in COL1A1 and COL1A2 gene resulting in a lethal outcome.

Amino acid	COL1A1 gene			COL1A2 gene		
	Number of non-lethal mutations	Number of lethal mutations	Total number of mutations	Number of non-lethal mutations	Number of lethal mutations	Total number of mutations
Ala	38	5	43	13	0	13
Arg	38	29	67	58	8	66
Asp	28	34	62	77	25	102
Cys	50	23	73	39	7	46
Glu	9	7	16	26	9	35
Leu	0	0	0	0	1	1
Phe	0	0	0	0	1	1
Ser	121	31	152	111	10	121
Val	14	25	39	60	19	79
Total	298	154	452	384	80	464

The ratio of lethal mutations is given.

regions of intermolecular interactions. Although the eight lethal regions constitute only 31% of the alpha2(I) chain, it appears that the proteoglycan binding-sites have a marked impact on overall mortality.

Despite the fact that lethality values are lower than previously calculated, glycine substitutions generally are associated with higher mortality when located in lethal clusters, except for alanine in the COL1A2 gene. According to previous studies, substitutions by hydrophobic valine and charged amino acids are more likely to lead to a fatal outcome than substitutions by small amino acids (Marini et al., 2012). Interestingly, substitutions by alanine, cysteine and serine result in lethal phenotype more often when located in lethal regions. This observation is consistent with the model proposed by Bodian et al. (2008), especially for lethal clusters of the COL1A1 gene. Therefore, it appears that ligand-binding sites may influence the clinical severity of mutations; however, the extent varies not only between amino acids but also depends on gene and particular lethal region in which the substitution occurs. Perhaps, observed differences may be a result of the distinct roles of each chain and region in intermolecular interactions, as well as variable effect of the substituting residue on collagen structure. It is possible that some of the resulting structural aberrations of the ligand binding-sites are more or less tolerated by particular extracellular molecules, resulting in a spectrum of lethal and non-lethal outcomes.

According to the primary assumptions, the localization of a mutation in a lethal region was believed to lead to a fatal manifestation, regardless of which amino acid was substituting for glycine (Marini et al., 2012). However, our findings indicate that the amino acids that replace the glycine in fact have a considerable influence on the clinical outcome of the mutation. Additionally, recurrence of mutation at a single glycine position have also been reported in lethal clusters of the COL1A2 gene. The vast majority of cases resulted in a range of OI types, with the severity depending on the substituting amino acid. Moreover, substitutions by the same amino acid in different patients resulted in differing non-lethal phenotypes, as well as lead to intermixed lethal and non-lethal cases, as observed in Patient 1 and her brother (Osteogenesis Imperfecta Variant Database, 2020). This

suggest that final clinical outcome of mutations located in lethal regions could be modified not only by amino acid *per se* but also by additional factors (Bodian et al., 2008; Xiao et al., 2015; Qiu et al., 2018).

On the basis of the current dataset of OI mutations, evaluation of the lethal regions' impact on clinical severity remains an elusive task. Although a limited number of available variants does not allow for a reliable genotype-phenotype correlation studies, presented paper provides a relevant information for a healthcare professionals. Perhaps increasing number of reported variants will in future allow more precise identification of the truly exclusively lethal sites within collagen type I genes. Till then, we believe that in the case of patients with confirmed pathogenic mutations located in lethal regions, the term "lethal" should not be used in genetic counseling or when interpreting molecular test results. We agree with other authors that mutations mapping to a lethal domains should not be the deciding factor, especially in prenatal counseling (Rauch et al., 2010; Kang et al., 2017). Clinicians should be aware that final outcome of such variants may result in a non-lethal, albeit severe, phenotype, or even a mild clinical manifestation. A molecular report alone indicating a pathogenic variant in the ligand binding region is not sufficient to predict the severity of the phenotype and clinical manifestation. However, this finding may suggest a potentially fatal outcome when correlated with a severe perinatal ultrasound image. Thus, timely genetic analysis may help to define the most appropriate perinatal care or treatment.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The sequencing data of four novel variants that we describe in the manuscript were deposited in ClinVar database that is directly linked with dbSNP database. For each variant a separate number is provided and listed in Table 2 as "rs number" and "accession number". The two variants that have been previously-reported were already added by other authors and are available in public databases (e.g., dbSNP, ClinVar, OIWD). The datasets generated for this study can be found in the Osteogenesis

Imperfecta Variant Database v2.0 website (<https://oi.gene.le.ac.uk/home.php>). Although the OIVD v2.0 has been frozen, it has been recently converted to the Global Variome shared LOVD v3.0. The previous version that has been used to prepare data analysis sections is still available for users.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Polish Mother's Memorial Hospital Research Institute Ethics Committee. Written informed consent to participate in this study was provided by the participants' legal guardian/next of kin. Written informed consent was obtained from the individual(s) for the publication of any potentially identifiable images or data included in this article.

REFERENCES

- Basel, D., and Steiner, R. D. (2009). Osteogenesis imperfecta: recent findings shed new light on this once well-understood condition. *Genet. Med.* 11, 375–385. doi: 10.1097/GIM.0b013e3181a1ff7b
- Bodian, D. L., Chan, T. F., Poon, A., Schwarze, U., Yang, K., Byers, P. H., et al. (2009). Mutation and polymorphism spectrum in osteogenesis imperfecta type II: implications for genotype-phenotype relationships. *Hum. Mol. Genet.* 18, 463–471. doi: 10.1093/hmg/ddn374
- Bodian, D. L., Madhan, M., Brodsky, B., and Klein, T. E. (2008). Predicting the clinical lethality of osteogenesis imperfecta from collagen glycine mutations. *Biochemistry* 47, 5424–5432. doi: 10.1021/bi800026k
- Byers, P. H., Wallis, G. A., and Willing, M. C. (1991). Review article Osteogenesis imperfecta: translation of mutation to phenotype. *J. Med. Genet.* 28, 433–442.
- Cole, W. G., and Dalglish, R. (1995). Perinatal lethal osteogenesis imperfecta. *J. Med. Genet.* 32, 284–289.
- Di Lullo, G. A., Sweeney, S. M., Körkkö, J., Ala-Kokko, L., and San Antonio, J. D. (2002). Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type I collagen. *J. Biol. Chem.* 277, 4223–4231. doi: 10.1074/jbc.M110709200
- Forlino, A., Cabral, W. A., Barnes, A. M., and Marini, J. C. (2012). New perspectives on osteogenesis imperfecta. *Nat. Rev. Endocrinol.* 7, 540–557. doi: 10.1038/nrendo.2011.81
- Forlino, A., and Marini, J. C. (2016). Osteogenesis imperfecta. *Lancet* 387, 1657–1671. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00728-X
- Hruskova, L., Fijalkowski, I., Van Hul, W., Marik, I., Mortier, G., Martasek, P., et al. (2016). Eight mutations including 5 novel ones in the COL1A1 gene in Czech patients with osteogenesis imperfecta. *Biomed. Pap.* 160, 442–447. doi: 10.5507/bp.2016.022
- Kang, H., Aryal, S., and Marini, J. C. (2017). Osteogenesis imperfecta: new genes reveal novel mechanisms in bone dysplasia. *Transl. Res.* 181, 27–48. doi: 10.1016/j.trsl.2016.11.005
- Lindahl, K., Åström, E., Rubin, C. J., Grigelioniene, G., Malmgren, B., Ljunggren, O., et al. (2015). Genetic epidemiology, prevalence, and genotype-phenotype correlations in the Swedish population with osteogenesis imperfecta. *Eur. J. Hum. Genet.* 23, 1042–1050. doi: 10.1038/ejhg.2015.81
- Maasalu, K., Nikopousis, T., Köks, S., Nõukas, M., Kals, M., Prans, E., et al. (2015). Whole-exome sequencing identifies de novo mutation in the COL1A1 gene to underlie the severe osteogenesis imperfecta. *Hum. Genomics* 9, 6. doi: 10.1186/s40246-015-0028-0
- Maioli, M., Gnoli, M., Boarini, M., Tremosini, M., Zambrano, A., and Pedrini, E. (2019). Genotype-phenotype correlation study in 364 osteogenesis imperfecta Italian patients. *Eur. J. Hum. Genet.* 27, 1090–1100. doi: 10.1038/s41431-019-0373-x
- Marini, J. C., and Blissett, A. R. (2013). New genes in bone development: what's new in osteogenesis imperfecta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98, 3095–3103. doi: 10.1210/jc.2013.1505

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AG and KS: conceptualization. KS: formal analysis, writing-original draft preparation, visualization, and project administration. KS, IP, LR, and DS: investigation. AG, DC-S, EJ-P, IM, ŁK, AJ, EB-O, and IJ: resources. AG: writing-review and editing. AG and LJ: supervision. KS and AG: funding acquisition. All authors agreed to be accountable for the content of the work.

FUNDING

Research was funded by Polish Mother's Memorial Hospital Research Institute, grant number 2016/IV/57-MN and OPUS National Science Centre Poland, grant number 2014/13/B/NZ5/03102.

- Marini, J. C., Forlino, A., Bächinger, H. P., Bishop, N. J., Byers, P. H., and De Paeppe, A. (2017). Osteogenesis imperfecta. *Primer* 3:17052. doi: 10.1038/nrdp.2017.52
- Marini, J. C., Forlino, A., Cabral, W. A., Barnes, A. M., San Antonio, J. D., Milgrom, S., et al. (2012). Consortium for osteogenesis imperfecta mutations in the helical domain of type I collagen: regions rich in lethal mutations align with collagen binding sites for integrins and proteoglycans. NIH Public Access. *Nat. Rev. Endocrinol.* 7:540. doi: 10.1002/humu.20429
- Marini, J. C., Lewis, M. B., Wang, Q., Chen, K. J., and Orrison, B. M. (1993). Serine for glycine substitutions in type I collagen in two cases of type IV osteogenesis imperfecta (OI). Additional evidence for a regional model of OI pathophysiology. *J. Biol. Chem.* 268, 2667–2673.
- Mortier, G. R., Cohn, D. H., and Cormier-Daire, V. (2019). Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2019 revision. *Am. J. Med. Genet. Part A* 179A, 2393–2419. doi: 10.1002/ajmg.a.61366
- Mouna Ben Amor, I., Glorieux, F. H., and Rauch, F. (2011). Genotype-phenotype correlations in autosomal dominant osteogenesis imperfecta. *J. Osteoporosis* 2011:540178. doi: 10.4061/2011/540178
- Online Mendelian Inheritance in Men (OMIM) (2021). *Online Mendelian Inheritance in Men. Osteogenesis Imperfecta*. Available online at: <https://www.omim.org> (accessed date May, 2021).
- Osteogenesis Imperfecta Variant Database. (2020). *Osteogenesis Imperfecta Variant Database (Part of the Leiden Open Variation Database). COL1A1*. Available online at: https://oi.gene.le.ac.uk/home.php?select_db=COL1A1 (accessed January, 2020). COL1A2. Available online at: https://oi.gene.le.ac.uk/home.php?select_db=COL1A2 (accessed January, 2020).
- Pollitt, R., McMahon, R., Nunn, J., Bamford, R., Afifi, A., Bishop, N., et al. (2006). Mutation analysis of COL1A1 and COL1A2 in patients diagnosed with osteogenesis imperfecta type I-IV. *Hum. Mutat.* 27:716. doi: 10.1002/humu.9430
- Qiu, Y., Mekkat, A., Yu, H., Yigit, S., Hamaia, S., Farndale, R. W., et al. (2018). Collagen Gly missense mutations: effect of residue identity on collagen structure and integrin binding. *J. Struct. Biol.* 203, 255–262. doi: 10.1016/j.jsb.2018.05.003
- Rauch, F., Lalic, L., Roughley, P., and Glorieux, F. H. (2010). Genotype-phenotype correlations in nonlethal osteogenesis imperfecta caused by mutations in the helical domain of collagen type I. *Eur. J. Hum. Genet.* 18, 642–647. doi: 10.1038/ejhg.2009.242
- Reuter, M. S., Schwabe, G. C., Ehlers, C., Marschall, C., Reis, A., Thiel, C., et al. (2013). Two novel distinct COL1A2 mutations highlight the complexity of genotype phenotype correlations in osteogenesis imperfecta and related connective tissue disorders. *Eur. J. Med. Genet.* 56, 669–673. doi: 10.1016/j.ejmg.2013.10.002
- Robinson, M. E., and Rauch, F. (2019). Mendelian bone fragility disorders. *Bone* 126, 11–17.

- Steiner, R. D., and Basel, D. (2019). "COL1A1/2 osteogenesis imperfecta. 2005 (updated 2019 December 12)," in *GeneReviews® [Internet]*, eds M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. H. Bean, G. Mirzaa, et al. (Seattle, WA: University of Washington, Seattle), 1993–2019.
- Sweeney, S. M., Orgel, J. P., Fertala, A., McAuliffe, J. D., Turner, K. R., Di Lullo, G. A., et al. (2008). Candidate cell and matrix interaction domains on the collagen fibril, the predominant protein of vertebrates. *J. Biol. Chem.* 283, 21187–21197. doi: 10.1074/jbc.M709319200
- Trejo, P., and Rauch, F. (2016). Osteogenesis imperfecta in children and adolescents—new developments in diagnosis and treatment. *Osteoporos Int.* 27, 3427–3437. doi: 10.1007/s00198-016-3723-3
- Van Dijk, F. S., and Silience, D. O. (2014). Osteogenesis imperfecta: clinical diagnosis, nomenclature and severity assessment. *Am. J. Med. Genet. Part A* 164A, 1470–1481.
- Wang, Q., Orrison, B. M., and Marini, C. (1993). Two additional cases of osteogenesis imperfecta with substitutions for glycine in the $\alpha 2(I)$ collagen chain. *J. Biol. Chem.* 268, 25162–25167.
- Xiao, J., Yang, Z., Sun, X., Addabbo, R., and Baum, J. (2015). Local amino acid sequence patterns dominate the heterogeneous phenotype for the collagen connective tissue disease Osteogenesis Imperfecta resulting from Gly mutations. *J. Struct. Biol.* 192, 127–137. doi: 10.1016/j.jsb.2015.05.002
- Zhytnik, L., Maasalu, K., Pashenko, A., Khmyzov, S., Reimann, E., Prans, E., et al. (2019). COL1A1/2 Pathogenic variants and phenotype characteristics in ukrainian osteogenesis imperfecta patients. *Front. Genet.* 10:722. doi: 10.3389/fgene.2019.00722
- Zhytnik, L., Maasalu, K., Reimann, E., Prans, E., Kõks, S., and Märtson, A. (2017). Mutational analysis of COL1A1 and COL1A2 genes among Estonian osteogenesis imperfecta patients. *Hum. Genomics* 11:19. doi: 10.1186/s40246-017-0115-5

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Salacińska, Pinkier, Rutkowska, Chlebna-Sokół, Jakubowska-Pietkiewicz, Michalus, Kępczyński, Salachna, Jamsheer, Bukowska-Olech, Jaszcuk, Jakubowski and Gach. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

CLINICAL REPORT

The first glycine-to-tryptophan substitution in the *COL1A1* gene identified in a patient with progressively-deforming Osteogenesis imperfecta

Kinga Sałacińska¹ | Izabela Michałus² | Iwona Pinkier¹ | Lena Rutkowska¹ | Danuta Chlebna-Sokol³ | Elżbieta Jakubowska-Pietkiewicz⁴ | Łukasz Kępczyński¹ | Dominik Salachna¹ | Agnieszka Gach¹

¹Department of Genetics, Polish Mother's Memorial Hospital Research Institute, Lodz, Poland

²Department of Endocrinology and Metabolic Diseases, Polish Mother's Memorial Hospital Research Institute, Lodz, Poland

³Department of Bone Metabolic Diseases, University Centre of Paediatric, Medical University of Lodz, Lodz, Poland

⁴Department of Paediatric Propedeutics and Bone Metabolic Diseases, Medical University of Lodz, Lodz, Poland

Correspondence

Kinga Sałacińska, Department of Genetics, Polish Mother's Memorial Hospital Research Institute, Lodz, Poland.
Email: kinga.salacinska@iczmpl.edu.pl

Funding information

Narodowe Centrum Nauki, Grant/Award Number: 2014/13/B/NZ5/03102; Polish Mother's Memorial Hospital Research Institute, Grant/Award Number: 2016/IV/MN-57

Abstract

Background: Osteogenesis imperfecta (OI) is a genetic disorder of connective tissue with variable phenotype and heterogeneous genetic background. Majority of reported mutations are glycine substitutions, whose clinical outcome ranges from mild to perinatal lethal. The phenotype appears to be influenced by the properties of amino acid side chain and the degree of structural aberration of collagen molecules. Since the genotype–phenotype correlation remains unclear, the severity of mutation is mostly predicted according to previously-reported cases. Although the number of OI variants is constantly expanding, no glycine-to-tryptophan substitutions have been reported in *COL1A1* gene.

Methods: A sample from a 15-year-old girl presenting with progressively-deforming OI type III was tested using an NGS custom gene panel. Multiple bioinformatic and interpretation tools, including mutation databases and conservation analysis, were used for variant classification. The presence of the mutation was verified by Sanger sequencing.

Results: A novel heterozygous mutation c.733G>T was identified in the *COL1A1* gene (p.Gly245Trp).

Conclusions: The discovery of this novel glycine-to-tryptophan substitution located in the *COL1A1* gene broadens the spectrum of mutations underlying this rare disease and provides useful information on the clinical outcome of such substitutions.

KEYWORDS

collagen type I, genotype–phenotype correlation, Next Generation Sequencing, osteogenesis imperfecta

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.
© 2022 The Authors. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* published by Wiley Periodicals LLC.

1 | INTRODUCTION

Osteogenesis imperfecta (OI) is a rare genetic connective tissue disorder. As the disease affects a number of tissues, the patients present a variety of skeletal and extra-skeletal features, the most characteristic being: susceptibility to fractures resulting from mild trauma, growth deficiency, long-bone and chest deformations, triangular-shaped face, blue sclera and dental abnormalities (Dentinogenesis imperfecta). The classification of OI was first established by Sillence et al. in 1979, who divided the disease into four subgroups based on clinical severity: Type I, with a mild non-deforming phenotype, Type II, associated with perinatal lethality, Type III, with a severe nonlethal progressively-deforming outcome, and Type IV, with moderate severity, i.e., intermediate between types I and III (Forlino & Marini, 2016; Steiner & Basel, 2005).

The disease is characterized by a heterogeneous genetic background with multiple loci, resulting in the OI phenotype. About 85%–90% of cases are associated with dominantly-inherited pathogenic variants in the *COL1A1* (OMIM 120150) and *COL1A2* (OMIM 120160) genes, most of which result from glycine substitutions known to cause qualitative changes in collagen type I structure. It is essential that glycine, which is the smallest amino acid, is present in every third position of the triple helical domain to maintain the proper structural conformation of pro- $\alpha 1(I)$ and pro- $\alpha 2(I)$ chains. Any substitution for glycine causes a qualitative alteration of the chains that are incorporated into heterotrimers, resulting in impaired helix formation, thus influencing the stability of the resulting collagen molecule and its interactions with other extracellular molecules. The clinical outcomes of mutations associated with amino acid substitutions range from mild to perinatal lethal depending on the substituent (Bodian et al., 2008; Forlino et al., 2011).

Potentially pathogenic mutations may occur in any of the 338 Gly-Xaa-Yaa triplets following the change of a single nucleotide in the codon for glycine (GGG, GGA, GGC, GGT). Depending on the location, the change can result in the glycine substitution for one of eight possible amino acids, i.e., alanine, arginine, aspartic acid, cysteine, glutamic acid, serine, tryptophan, or valine (Dalglish, 2014). Previous studies on patients with OI have reported examples of seven such substitutions in the *COL1A1* gene, involving all but the tryptophan residue, this being a large, non-polar aromatic amino acid containing an indole side chain.

There are only ten potential loci in the *COL1A1* gene that may allow for glycine (GGG)-to-tryptophan (TGG) substitution. In the *COL1A2* gene, three distinct glycine-to-tryptophan mutations have been noted in the OIVD

(Osteogenesis Imperfecta Variant Database) to date: p.Gly-319Trp, p.Gly367Trp and p.Gly814Trp (Dalglish & Kheng Teh, 2020; Hrušková et al., 2015; Nuytinck et al., 2000).

Our present study reports the first glycine-to-tryptophan substitution in the *COL1A1* gene, identified in a patient with a progressively-deforming OI phenotype. This description of a novel mutation broadens our understanding of the heterogeneous genetic background of this rare disease.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Subjects

A 15-year-old girl of Caucasian origin was admitted to hospital with a suspected severe form of OI. At the age of 11, molecular screening for pathogenic mutation was performed, as the patient had been included in a research project on genetic background of OI. The study was approved by the local Ethics Committee (No. 108/2015). The legal guardian gave informed consent for the patient to take part in the study.

2.2 | Methods

The pathogenic variant was detected by Next Generation Sequencing (NGS), using a custom-designed gene panel for resequencing exons and flanking non-coding sequences of known and candidate genes related to OI (Design Studio software, Illumina, USA) (Salacińska et al., 2021). Genomic DNA was isolated automatically from biobanked peripheral blood (MagCore Genomic DNA Whole Blood Kit, RBC Bioscience, Taiwan). A library composed of 710 amplicons, with a mean length of 175bp and 99% coverage, was prepared using TruSeq Custom Amplicon reagents, according to the manufacturer's protocol. The library was sequenced on a MiniSeq platform (Illumina, USA).

The obtained data was prioritized and variant filtering was performed using Illumina VariantStudio software (human genome reference GRCh37 version). Further analysis was performed using the Varsome freely-available variant interpretation tool (<https://varsome.com/>), supplemented by information available in public databases (dbSNP, ClinVar, HGMD, OIVD) and literature. Variant analysis was performed according to the ACMG recommendations. Class 3, 4, and 5 variants were validated by Sanger sequencing (3500 Genetic Analyzer, ThermoFisher Scientific, USA). Clustal Omega (1.2.4) and Jalview (2.11.0) were used to generate alignments between

multiple sequences and analyze the conservation of novel variants across species.

3 | RESULTS

3.1 | Patient profile

The patient is a 15-year-old girl, a second child of non-consanguineous parents, delivered by cesarean section in week 40 with an Apgar score of 9/10. She was suspected of OI in the second week of life after first postnatal fracture of right femur. Diagnosis was confirmed by Babygram examination and the presence of characteristic clinical features including a triangular shaped face and soft skull bones. She had sustained about 20 postnatal fractures of the upper and lower limbs, the most recent fracture occurred at the age of 13. Weight and body height are both below the third centile. Patient presents skeletal deformations such as bowed and shortened lower limbs, a barrel-shaped chest and reduced height of the lower thoracic to lumbar *vertebrae* (Th11-L3; vertebral compression fractures). Further lower limb deformations were reduced by surgical interventions (2011—corrective osteotomies of both tibia bones; 2012—telescopic rods in both femurs) (Figure 1). The girl suffers from contractures of knee and elbow joints. Extra-skeletal features characteristic for OI, such as blue sclera, prominent forehead and Dentinogenesis imperfecta are observed. Densitometry results from 2016 revealed decreased bone mineral

density, indicating osteoporosis (total body BMD 0.408 g/cm², Z-score −4.3; spine L1-L4 BMD 0.525 g/cm², Z-score −2.7). Treatment with bisphosphonates started at week 5 of life. Within 10 years, she had received 31 cycles of pamidronate. She currently uses a wheelchair or walks with additional support. The family history is negative, and the patient has a healthy brother. Based on the pathogenic character of the variant, we suspect that it is of *de novo* origin in the patient; however, no DNA sample was available from the parents.

3.2 | Characteristics of the novel variant

A novel single nucleotide variant, c.733G>T, that results in glycine-to-tryptophan substitution (p.Gly245Trp) was identified in exon 10 of the *COL1A1* gene (NM_000088.3) at position 17:48274558. The variant reached a coverage of 277 reads and 114 alternative reads. The variant meets the criteria of ACMG for a likely pathogenic variant, as supported by a considerable body of evidence. The variant was absent in control samples from population databases (Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project, Exome Aggregation Consortium), nor was it found in the gnomAD exomes or gnomAD genomes, reaching good coverage of the locus (31.0–94.4).

Identified glycine-to-tryptophan missense mutation represents a common mechanism of glycine substitutions to other amino acids characteristic for OI pathogenesis. For the *COL1A1* gene, a low rate of benign missense

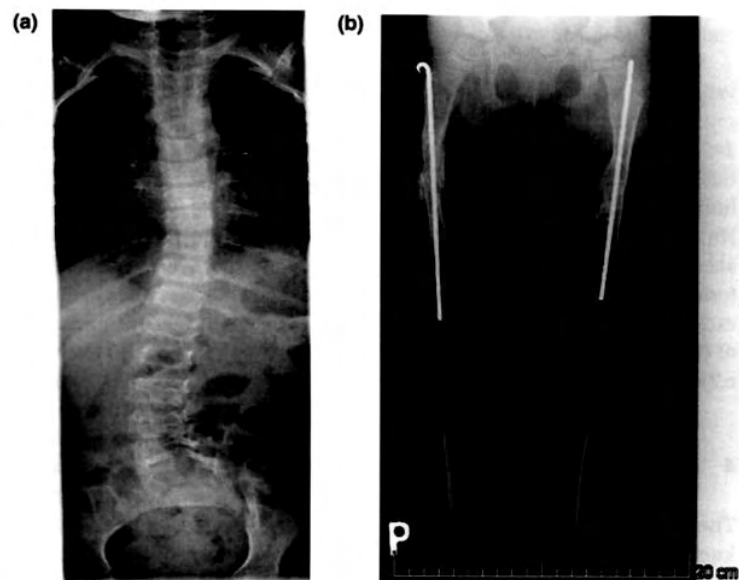


FIGURE 1 (a) X-ray of the spine AP projection (b) X-ray of lower limbs at the age of 4 years showing Fassier-Duval telescopic rods in femurs.

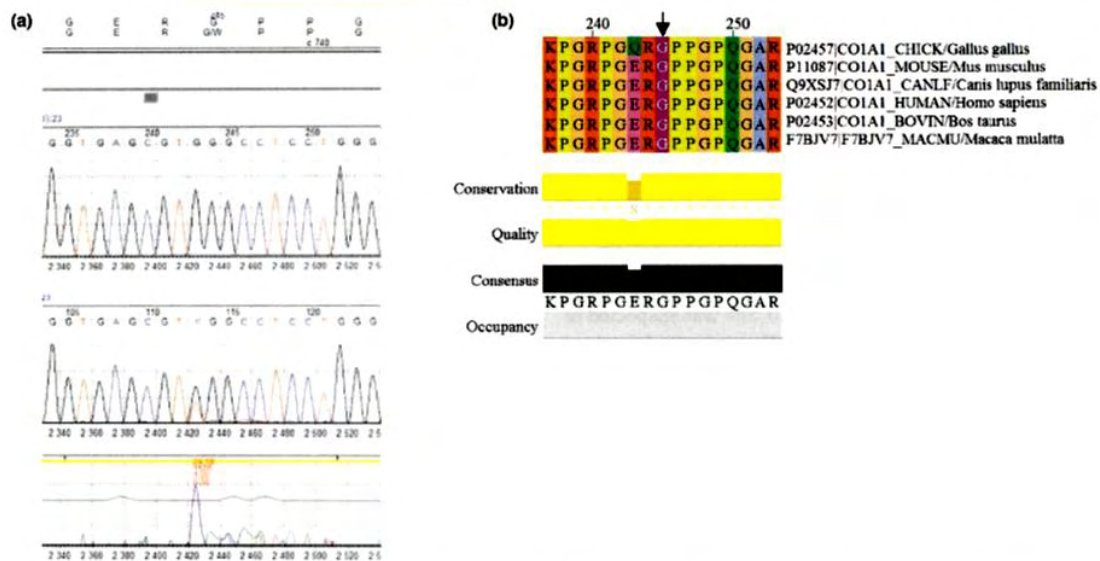


FIGURE 2 (a) Sanger sequencing chromatogram of the identified variant. (b) Multiple sequence alignment analysis of the novel variant across several species in Jalview 2.11.0, Clustal omega 1.2.4. The conserved columns with the highest score of 11 are indicated by "*".

mutations has been reported: 411 out of 451 non-VUS missense variants, and 772 out of 1217 clinically-reported variants are pathogenic. Multiple lines of computational evidence indicate a deleterious effect on the gene or gene product: a pathogenic verdict was obtained, based on nine pathogenic predictions compared to no benign predictions and one uncertain prediction. The variant was submitted to ClinVar by the Polish Mother's Memorial Hospital Research Institute (accession number SCV000994669.1) and added to the dbSNP database (rs1598299275).

Multiple Sequence Alignment analysis found the novel variant site to have the highest conservation score across several species (Figure 2). Neither the c.733G>T (p.Gly-245Trp) mutation, nor any variant at c.733 or p.245 position in the *COL1A1*, has been previously reported in any human mutation database including the dedicated OI.VD. No 3D structural model for molecular modeling is available in the Protein Data Bank. The possibility that the performed NGS procedure demonstrated technical bias was excluded, as none other of the 47 patients with a diagnosis of OI sequenced simultaneously with the proband had the c.733G>T variant.

4 | DISCUSSION

The substitution of glycine by other amino acid is well known to play a role in the pathogenesis of OI. Over the years, several models have been developed for relating

missense mutations to particular OI type. The substituting residue, its position in the chain and the gene in which mutation occurs are all suspected to influence the final clinical outcome (Bodian et al., 2008, 2009; Marini et al., 2007). Genotype-to-phenotype correlation studies have shown that the type of amino acid substituting for glycine remains an important variable, as recurrence at a single glycine locus by different residues has been found to often result in distinct OI types (Bodian et al., 2009).

The mortality associated with missense mutations ranges from 0% to 64%, depending on the type of substituent amino acid, and this value differs between *COL1A1* and *COL1A2* (Salacińska et al., 2021). This phenomenon is possibly related to the spacial constraints of the triple helix and the identity of the residue replacing glycine, which in turn depends on properties of its side chain: amino acids with a branched nonpolar (Val) or charged side chain (Arg, Asp, Glu) are associated with a more severe phenotype than small polar (Cys, Ser) or nonpolar (Ala) residues (Basel & Steiner, 2009; Bodian et al., 2008, 2009). This indicates that larger amino acids cause greater disruption of the triple helix and hence, a more severe phenotype (Basel & Steiner, 2009).

The presented mutation is the first record of a glycine-to-tryptophan substitution in the *COL1A1* gene. The variant, p.Gly245Trp, was identified in a patient presenting with a progressively-deforming OI phenotype. As tryptophan belongs to a group of amino acids with a branched

hydrophobic side chain, similarly to valine, the severe phenotype resulting from this novel mutation is consistent with the proposed correlation between residue identity on collagen structure and clinical outcome (Forlino & Marini, 2016). Although the lethality of amino acids varies significantly between collagen type I genes, the three glycine-to-tryptophan substitution reported in *COL1A2* resulted in progressively-deforming Type III, similarly to the novel variant reported herein (Bodian et al., 2009; Dalgleish & Kheng Teh, 2020; Hrušková et al., 2015; Nuytinck et al., 2000).

However, several unsolved problems still remain concerning the genotype–phenotype correlation of OI. The unclear influence of the type of substituent amino acid on the clinical manifestation, the impact of modifying factors, and the limited success of prediction models, all highlight the complexity of the OI pathomechanism (Bodian et al., 2009; Forlino et al., 2011). Although it is often hard to predict the phenotype associated with a given substitution, healthcare professionals can still make a rough prognosis based on certain principles and previously-reported cases. Therefore, our finding provides valuable information on the clinical outcome of glycine-to-tryptophan substitutions in the *COL1A1* gene. By broadening our knowledge of the spectrum of mutations underlying OI, we move toward a fuller understanding of the genotype–phenotype correlation of this heterogeneous disease.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Agnieszka Gach and Kinga Sałacińska: conceptualization. Kinga Sałacińska: formal analysis, writing-original draft preparation, visualization, and project administration. Kinga Sałacińska, Iwona Pinkier, Lena Rutkowska, and Dominik Salachna: investigation. Izabela Michałus, Danuta Chlebna-Sokół, Elżbieta Jakubowska-Pietkiewicz, Łukasz Kępczyński: resources. Agnieszka Gach: writing-review, editing and supervision. Kinga Sałacińska and Agnieszka Gach: funding acquisition. All authors agreed to be accountable for the content of the work.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the patient for participation in this study.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there are no competing interests associated with the manuscript.

ETHICS STATEMENT

The study was approved by the local Ethics Committee (No. 108/2015). The legal guardian gave informed consent for the patient to take part in the study.

ORCID

Kinga Sałacińska  <https://orcid.org/0000-0002-1802-8795>

REFERENCES

- Basel, D., & Steiner, R. D. (2009). Osteogenesis imperfecta: Recent findings shed new light on this once well-understood condition. *Genetics in Medicine*, 11(6), 375–385. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181a1ff7b>
- Bodian, D. L., Madhan, B., Brodsky, B., & Klein, T. E. (2008). Predicting the clinical lethality of Osteogenesis imperfecta from collagen glycine mutations. *Biochemistry*, 47(19), 5424–5432. <https://doi.org/10.1021/bi800026k>
- Bodian, D. L., Chan, T. F., Poon, A., Schwarze, U., Yang, K., Byers, P. H., Kwok, P. Y., & Klein, T. E. (2009). Mutation and polymorphism spectrum in Osteogenesis imperfecta type II: Implications for genotype-phenotype relationships. *Human Molecular Genetics*, 18(3), 463–471. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn374>
- Dalgleish III, R. (2014). Clinical and molecular genetics of Osteogenesis imperfecta, Chapter 10: Osteogenesis imperfecta genotypes and genotype–phenotype relationships. In J. Shapiro, P. H. Byers, F. H. Glorieux, & P. D. Sponseller (Eds.), *Osteogenesis imperfecta—A translational approach to brittle bone disease* (pp. 103–110). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397165-4.00010-1>
- Dalgleish, R., & Kheng Teh, W. (2020). Collagen type I alpha 1 chain (COL1A1); collagen type I alpha 2 chain (COL1A2). In *Global variome shared LOVD*. Leiden Open Variation Database. LOVD v.3.0 Build 26c. <https://databases.lovd.nl/shared/genes/COL1A1>, <https://databases.lovd.nl/shared/genes/COL1A2>
- Forlino, A., Cabral, W. A., Barnes, A. M., & Marini, J. C. (2011). New perspectives on Osteogenesis imperfecta. *Nature Reviews Endocrinology*, 7(9), 540–557. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.81>
- Forlino, A., & Marini, J. C. (2016). Osteogenesis imperfecta. *Lancet*, 387(10028), 1657–1671. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00728-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00728-X)
- Hrušková, L., Mařík, I., Mazurová, S., Martásek, P., & Mazura, I. (2015). COL1A2 gene analysis in a Czech Osteogenesis imperfecta patient: A candidate novel mutation in a patient affected by Osteogenesis imperfecta type 3. *Advances in Genomics and Genetics*, 5, 275–281. <https://doi.org/10.2147/AGG.S58766>
- Marini, J. C., Forlino, A., Cabral, W. A., Barnes, A. M., San Antonio, J. D., Milgrom, S., Hyland, J. C., Körkkö, J., Prockop, D. J., De Paepe, A., Coucke, P., Symoens, S., Glorieux, F. H., Roughley, P. J., Lund, A. M., Kuurila-Svahn, K., Hartikka, H., Cohn, D. H., Krakow, D., ... Byers, P. H. (2007). Consortium for Osteogenesis imperfecta mutations in the helical domain of type I collagen: Regions rich in lethal mutations align with collagen binding sites for integrins and proteoglycans. *Human Mutation*, 28(3), 209–221. <https://doi.org/10.1002/humu.20429>
- Nuytinck, L., Tükel, T., Kayserili, H., Apak, M. Y., & De Paepe, A. (2000). Glycine to tryptophan substitution in type I collagen in a patient with OI type III: A unique collagen mutation. *Journal of Medical Genetics*, 37(5), 371–375. <https://doi.org/10.1136/jmg.37.5.371>

- Salacińska, 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. (2021). 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. *Frontiers in Genetics*, 12, 692978. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.692978>
- Steiner, R. D., & Basel, D. (2005). COL1A1/2 Osteogenesis imperfecta. In M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. H. Bean, K. W. Gripp, G. M. Mirzaa, & A. Amemiya (Eds.), *GeneReviews** (pp. 1993–2022). University of Washington.

How to cite this article: Salacińska, K., Michałus, I., Pinkier, I., Rutkowska, L., Chlebna-Sokół, D., Jakubowska-Pietkiewicz, E., Kępczyński, Ł., Salachna, D., & Gach, A. (2022). The first glycine-to-tryptophan substitution in the *COL1A1* gene identified in a patient with progressively-deforming Osteogenesis imperfecta. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 10, e1996. <https://doi.org/10.1002/mgg3.1996>

13. Zgoda Komisji Bioetycznej

Łódź, dnia 08 grudnia 2015 r.

Dr n. med. Agnieszka Gach
Zakład Genetyki
Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki

Komisja Bioetyczna przy Instytucie Centrum Zdrowia Matki Polki działając zgodnie z zasadami Dobrej Praktyki Klinicznej na posiedzeniu w dniu 08 grudnia 2015 r. rozpatrywała wniosek dotyczący pracy:

„Genetyczne uwarunkowania wrodzonej łamliwości kości”

Opinia Nr 108/2015

Komisja Bioetyczna przy Instytucie Centrum Zdrowia Matki Polki zapoznała się z ww projektem eksperymentu medycznego, przeanalizowała wniosek, wysłuchała opinii recenzenta o przedstawionym projekcie i wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz tajnego głosowania, po rozważeniu kryteriów etycznych oraz celowości i wykonalności projektu pozytywnie zaopiniowała projekt eksperymentu medycznego.

Uchwałę podjęto jednogłośnie.
Uchwałę podjęto przy sprzeciwie

Przewodnicząca:

Dr hab. med. Iwona Maroszyńska, prof. ICZMP.....

Zastępca Przewodniczącej:

Prof. dr hab. n. farm. Daria Orszulak-Michalak

Członkowie:

Mec. Michał Araszkiewicz

Prof. dr hab. n. med. Tadeusz Biegański

Dr n. med. Paweł Czekalski

Mgr Grażyna Korybut

Prof. dr hab. med. Jerzy Niedzielski

Prof. dr hab. med. Jacek Rysz

Prof. dr hab. med. Krzysztof Szaflik

Dr n. filozofii Wojciech Sztombka

Prof. dr n. med. Krzysztof Szyłło

Ks. dr hab. Jan Wolski

Prof. dr hab. n. med. Krzysztof Zeman

14. Oświadczenia autorów

Kińska Sałacińska
ul. Skrzydlatek 16B
95-050 Kawęczynów k
.....
(dane osobowe)

...kda¹....., dn. 30.10.2023..

OŚWIADCZENIE

Jako pierwszy autor publikacji:

"NGS analysis of collagen type I genes in Polish patients with Osteogenesis imperfecta: a nation-wide multicenter study"

Oświadczam, iż w wyżej wymienionej pracy mój wkład w powstanie publikacji polegał na: stworzeniu konceptu pracy, opracowaniu metodologii, pozyskaniu finansowania, wykonaniu części laboratoryjnej, wykonaniu analiz, interpretacji wyników, napisaniu finalnej wersji manuskryptu.

Mój udział w realizacji pracy szacuję na 70%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy przedłożonej przez mgr Kingę Sałacińską, jako części cyklu publikacji do przeprowadzenia przewodu doktorskiego.

.....Kińska Sałacińska.....
podpis

Jwona Pinkiewicz

(dane osobowe)

Łódź, dn. 30.10.2023

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji:

"NGS analysis of collagen type I genes in Polish patients with Osteogenesis imperfecta: a nation-wide multicenter study"

Oświadczam, iż w wyżej wymienionej pracy mój wkład w powstanie publikacji polegał na: wykonaniu części laboratoryjnej.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy przedłożonej przez mgr Kingę Sałacińską, jako części cyklu publikacji do przeprowadzenia przewodu doktorskiego.

J. Pinkiewicz

podpis

.....Bodi....., dn. 30.10.2023r.

Berna Rutkowska
.....
(dane osobowe)
ml. Długa 6/A11
99-210 Mniejów

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji:

"NGS analysis of collagen type I genes in Polish patients with Osteogenesis imperfecta: a nation-wide multicenter study"

Oświadczam, iż w wyżej wymienionej pracy mój wkład w powstanie publikacji polegał na: wykonaniu części laboratoryjnej.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy przedłożonej przez mgr Kingę Sałacińską, jako części cyklu publikacji do przeprowadzenia przewodu doktorskiego.

Rutkowska
.....
podpis

Danuta Chlebna-Sokoł
(dane osobowe)
prof. hab. n. med.

.....toruń.....dn. 31.10.2023

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji:

"NGS analysis of collagen type I genes in Polish patients with Osteogenesis imperfecta: a nation-wide multicenter study"

Oświadczam, iż w wyżej wymienionej pracy mój wkład w powstanie publikacji polegał na: zebraniu materiału badawczego.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy przedłożonej przez mgr Kingę Salacińską, jako części cyklu publikacji do przeprowadzenia przewodu doktorskiego.

Danuta Chlebna-Sokoł
podpis

Prof. dr hab. n. med.
Danuta CHLEBNA-SOKOŁ
Specjalista Chorób Dzieci
i Medycyny Wieków Rozwojowych
4008427

Izabela Michalska
ul. Skłodowska 4
95-200 Pabianice
(dane osobowe)

Łódź dn. 3.11.2023

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji:

"NGS analysis of collagen type I genes in Polish patients with Osteogenesis imperfecta: a nation-wide multicenter study"

Oświadczam, iż w wyżej wymienionej pracy mój wkład w powstanie publikacji polegał na: zebraniu materiału badawczego.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy przedłożonej przez mgr Kingę Sałacińską, jako części cyklu publikacji do przeprowadzenia przewodu doktorskiego.

I. Michalska
.....
podpis
dr. n. med.
Izabela Michalska
specjalista pediatrii i neonatologii
1896973

Lukasz Kępczyński
(dane osobowe)

Łódź, dn. 03.11.2023

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji:

"NGS analysis of collagen type I genes in Polish patients with Osteogenesis imperfecta: a nation-wide multicenter study"

Oświadczam, iż w wyżej wymienionej pracy mój wkład w powstanie publikacji polegał na: zebraniu materiału badawczego i wykonaniu obliczeń statystycznych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy przedłożonej przez mgr Kingę Sałacińską, jako części cyklu publikacji do przeprowadzenia przewodu doktorskiego.


.....
podpis

Dominiła Salacińska
93-355 6502
ul. Tużyńska 154/24
.....
(dane osobowe)

.....6002....., dn. 31.10.23

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji:

"NGS analysis of collagen type I genes in Polish patients with Osteogenesis imperfecta: a nation-wide multicenter study"

Oświadczam, iż w wyżej wymienionej pracy mój wkład w powstanie publikacji polegał na: opracowaniu danych bioinformatycznych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy przedłożonej przez mgr Kingę Salacińską, jako części cyklu publikacji do przeprowadzenia przewodu doktorskiego.

.....
.....
podpis

.....
Tatiana Chilańska
(dane osobowe)

.....Idla'.....dn. 20.10.2023

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji:

"NGS analysis of collagen type I genes in Polish patients with Osteogenesis imperfecta: a nation-wide multicenter study"

Oświadczam, iż w wyżej wymienionej pracy mój wkład w powstanie publikacji polegał na: zebraniu materiału badawczego.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy przedłożonej przez mgr Kingę Sałacińską, jako części cyklu publikacji do przeprowadzenia przewodu doktorskiego.

.....T. Chilańska.....
podpis

Prof. dr hab. n. med. Aleksander Jamsheer
specjalista genetyki klinicznej, lekarz 1988516
specjalista laboratoryjnej genetyki medycznej
diagnosta laboratoryjny 11744
mgr biotechnologii
tel. +48 501 760 675

Poznań, dn. 30.10.2023

.....
(dane osobowe)

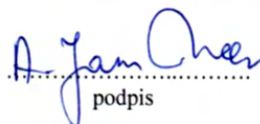
OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji:

*"NGS analysis of collagen type I genes in Polish patients with Osteogenesis imperfecta:
a nation-wide multicenter study"*

Oświadczam, iż w wyżej wymienionej pracy mój wkład w powstanie publikacji polegał na:
zebraniu materiału badawczego.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy przedłożonej przez mgr Kingę
Sałacińską, jako części cyklu publikacji do przeprowadzenia przewodu doktorskiego.


.....
podpis

Kierownik
Oddziału Klinicznego Pediatrii, Onkologii Dziecięcej
i Chorób Metabolicznych Kości
Katedry Pediatrii i Endokrynologii Dziecięcej
Wydziału Nauk Medycznych w Katowicach
(dane osobowe)
dr hab. n. med. Paweł Marasik

19CH9, dn. 30.10.2021

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji:

*"NGS analysis of collagen type I genes in Polish patients with Osteogenesis imperfecta:
a nation-wide multicenter study"*

Oświadczam, iż w wyżej wymienionej pracy mój wkład w powstanie publikacji polegał na: zebraniu materiału badawczego.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy przedłożonej przez mgr Kingę Sałacińską, jako części cyklu publikacji do przeprowadzenia przewodu doktorskiego.

Kierownik
Oddziału Klinicznego Pediatrii, Onkologii Dziecięcej
i Chorób Metabolicznych Kości
Katedry Pediatrii i Endokrynologii Dziecięcej
Wydziału Nauk Medycznych w Katowicach
dr hab. n. med. Paweł Marasik
podpis

Szrewn, dn. 30.10.2023

MAKOORZATA WILK
(dane osobowe)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji:

"NGS analysis of collagen type I genes in Polish patients with Osteogenesis imperfecta: a nation-wide multicenter study"

Oświadczam, iż w wyżej wymienionej pracy mój wkład w powstanie publikacji polegał na: zebraniu materiału badawczego.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy przedłożonej przez mgr Kingę Sałacińską, jako części cyklu publikacji do przeprowadzenia przewodu doktorskiego.

Matgorzata Wilk
podpis

prof. dr hab. n. med
Maria Gieuska
(dane osobowe)

Inweciu, dn. 03.11.2023

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji:

"NGS analysis of collagen type I genes in Polish patients with Osteogenesis imperfecta: a nation-wide multicenter study"

Oświadczam, iż w wyżej wymienionej pracy mój wkład w powstanie publikacji polegał na: zebraniu materiału badawczego.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy przedłożonej przez mgr Kingę Sałacińską, jako części cyklu publikacji do przeprowadzenia przewodu doktorskiego.

prof. dr hab. med. MARIA GIŻEWSKA
specjalista chorób dzieci
i pediatrii metabolicznej
tel. 60 132 22 44
74 332 04 1

podpis

....., dn. 03.11.2023r.

Iwona Stęcewicz
(dane osobowe)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji:

"NGS analysis of collagen type I genes in Polish patients with Osteogenesis imperfecta: a nation-wide multicenter study"

Oświadczam, iż w wyżej wymienionej pracy mój wkład w powstanie publikacji polegał na: zebraniu materiału badawczego.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy przedłożonej przez mgr Kingę Sałacińską, jako części cyklu publikacji do przeprowadzenia przewodu doktorskiego.

.....
podpis
dr n. med. Iwona Stęcewicz
specjalista pediatria
4453267

MAGDA RYBAK-KRZYSZKOWSKA
ŁĘDNICA GÓRNA 472
32-020 WIELICZKA

Kraków, dn. 20/10/2023

.....
(dane osobowe)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji:

"NGS analysis of collagen type I genes in Polish patients with Osteogenesis imperfecta: a nation-wide multicenter study"

Oświadczam, iż w wyżej wymienionej pracy mój wkład w powstanie publikacji polegał na: zebraniu materiału badawczego.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy przedłożonej przez mgr Kingę Salacińską, jako części cyklu publikacji do przeprowadzenia przewodu doktorskiego.

Dr n. med. Magda Rybak-Krzyszkowska

Specjalista perinatologii i ginekologii
Specjalista genetyki klinicznej
Master in Maternal-Fetal Medicine
Fetal and Neonatal Education Barcelona,
University of Barcelona
1302348

.....
podpis

Agnieszka Gach
95-010 Anielin Swędowski
Ul. Wypoczynkowa 24

Łódź, dn.27.10.2023

.....
(dane osobowe)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji:

"NGS analysis of collagen type I genes in Polish patients with Osteogenesis imperfecta: a nation-wide multicenter study"

Oświadczam, iż w wyżej wymienionej pracy mój wkład w powstanie publikacji polegał na: stworzeniu konceptu pracy, opracowaniu metodologii, pozyskaniu finansowania, zebraniu materiału badawczego, korekcie manuskryptu i zaakceptowaniu jego ostatecznej treści.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy przedłożonej przez mgr Kingę Sałacińską, jako części cyklu publikacji do przeprowadzenia przewodu doktorskiego.


.....
podpis

Kinga Sałacińska
ul. Skrydlata 13B
95-052 Kombanów k.....
(dane osobowe)

....., dn. 30.10.2023

OŚWIADCZENIE

Jako pierwszy autor publikacji:

"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"

Oświadczam, iż w wyżej wymienionej pracy mój wkład w powstanie publikacji polegał na: stworzeniu konceptu pracy, opracowaniu metodologii, pozyskaniu finansowania, wykonaniu części laboratoryjnej, wykonaniu analiz, interpretacji wyników, napisaniu finalnej wersji manuskryptu.

Mój udział w realizacji pracy szacuję na 77%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy przedłożonej przez mgr Kingę Sałacińską, jako części cyklu publikacji do przeprowadzenia przewodu doktorskiego.

.....
podpis

Łódź, dn. 30.10.2023

Jwona Rnkier
(dane osobowe)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji:

„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”

Oświadczam, iż w wyżej wymienionej pracy mój wkład w powstanie publikacji polegał na: wykonaniu części laboratoryjnej.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy przedłożonej przez mgr Kingę Sałacińską, jako części cyklu publikacji do przeprowadzenia przewodu doktorskiego.

J. Rnkier
podpis

Podzi, dn. 30.10.2023r.

Lena Rutkowska
(dane osobowe)
ul. Długa 6 / M1
99-210 Uniejów

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji:

„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”

Oświadczam, iż w wyżej wymienionej pracy mój wkład w powstanie publikacji polegał na: wykonaniu części laboratoryjnej.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy przedłożonej przez mgr Kingę Sałacińską, jako części cyklu publikacji do przeprowadzenia przewodu doktorskiego.

L. Rutkowska
podpis

Danuta Chlebna-Sokol
(dane osobowe)
prof. dr hab. n. med.

to'da, dn. 31.10.2023

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji:

"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"

Oświadczam, iż w wyżej wymienionej pracy mój wkład w powstanie publikacji polegał na: zebraniu materiału badawczego.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy przedłożonej przez mgr Kingę Sałacińską, jako części cyklu publikacji do przeprowadzenia przewodu doktorskiego.

D. Chlebna-Sokol

podpis

Prof. dr hab. n. med.
Danuta CHLEBNA-SOKÓŁ
Specjalista Choroź Dzieci
i Medycyny Wieku Rozwojowego
4008427

Izabela Michalus
ul. Skłodowska 7
95-200 Pabianice
.....
(dane osobowe)

.....
Lódź dn. 3.11.2023

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji:

"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"

Oświadczam, iż w wyżej wymienionej pracy mój wkład w powstanie publikacji polegał na: zebraniu materiału badawczego.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy przedłożonej przez mgr Kingę Sałacińską, jako części cyklu publikacji do przeprowadzenia przewodu doktorskiego.

.....
I. Michalus
podpis

dr. n. med.
Izabela Michalus
specjalista pediatrii i neonatologii
1.8.96.973

Lukasz Kparyński
(dane osobowe)

Łódź, dn. 03.11.2023

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji:

"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"

Oświadczam, iż w wyżej wymienionej pracy mój wkład w powstanie publikacji polegał na: zebraniu materiału badawczego.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy przedłożonej przez mgr Kingę Sałacińską, jako części cyklu publikacji do przeprowadzenia przewodu doktorskiego.


podpis

Domini Salachna
03-355 6002
ul. Tuszyńska 154/24
.....
(dane osobowe)

..... 6002, dn. 31.10.23

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji:

"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"

Oświadczam, iż w wyżej wymienionej pracy mój wkład w powstanie publikacji polegał na: opracowaniu danych bioinformatycznych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy przedłożonej przez mgr Kingę Salacińską, jako części cyklu publikacji do przeprowadzenia przewodu doktorskiego.


.....
podpis

Prof. dr hab. n. med. Aleksander Jamsheer
specjalista genetyki klinicznej, lekarz 1988816
specjalista laboratoryjnej genetyki medycznej
diagnosta laboratoryjny 11744
mgr biotechnologii
tel. +48 501 760 675

Poznań, dn. 30.10.2023

.....
(dane osobowe)

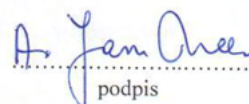
OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji:

"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"

Oświadczam, iż w wyżej wymienionej pracy mój wkład w powstanie publikacji polegał na: zebraniu materiału badawczego.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy przedłożonej przez mgr Kingę Sałacińską, jako części cyklu publikacji do przeprowadzenia przewodu doktorskiego.


.....
podpis

Poznań, dn. 31.10.2023

dr hab. n. med. Ewelina Bukowska-Olech
Katedra i Zakład Genetyki Medycznej
Uniwersytet Medyczny
im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

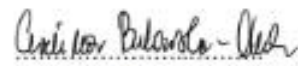
OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji:

"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"

Oświadczam, iż w wyżej wymienionej pracy mój wkład w powstanie publikacji polegał na: zebraniu materiału badawczego.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy przedłożonej przez mgr Kingę Salacińską, jako części cyklu publikacji do przeprowadzenia przewodu doktorskiego.


.....
podpis

Łódź, dn. 31.10.2023

dr hab. n. med. Lucjusz Jakubowski
94-050 Łódź, Al. Wyszyńskiego 89 m 18
(dane osobowe)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji:

"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"

Oświadczam, iż w wyżej wymienionej pracy mój wkład w powstanie publikacji polegał na: opiece merytorycznej nad realizacją badań.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy przedłożonej przez mgr Kingę Sałacińską, jako części cyklu publikacji do przeprowadzenia przewodu doktorskiego.

Lucjusz Jakubowski
podpis

Agnieszka Gach
95-010 Anielin Swędowski
Ul. Wypoczynkowa 24

Łódź, dn.27.10.2023

.....
(dane osobowe)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji:

"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"

Oświadczam, iż w wyżej wymienionej pracy mój wkład w powstanie publikacji polegał na: stworzeniu konceptu pracy, opracowaniu metodologii, pozyskaniu finansowania, zebraniu materiału badawczego, korekcie manuskryptu i zaakceptowaniu jego ostatecznej treści.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy przedłożonej przez mgr Kingę Sałacińską, jako części cyklu publikacji do przeprowadzenia przewodu doktorskiego.


.....
podpis

Kinga Sałacińska
ul. Skrydlata 18B
95-050 Konstantynów Ł.
(dane osobowe)

...kddz', dn. 30.10.2023..

OŚWIADCZENIE

Jako pierwszy autor publikacji:

"The first glycine-to-tryptophan substitution in the COL1A1 gene identified in a patient with progressively-deforming Osteogenesis imperfecta"

Oświadczam, iż w wyżej wymienionej pracy mój wkład w powstanie publikacji polegał na: stworzeniu konceptu pracy, opracowaniu metodologii, pozyskaniu finansowania, wykonaniu części laboratoryjnej, wykonaniu analiz, interpretacji wyników, napisaniu finalnej wersji manuskryptu.

Mój udział w realizacji pracy szacuję na 70%.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy przedłożonej przez mgr Kingę Sałacińską, jako części cyklu publikacji do przeprowadzenia przewodu doktorskiego.

.....
podpis

Izabela Michałus
ul. Skłodowska 7
95-200 Pabianice
(dane osobowe)

Łódź, dn. 3.11.2023

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji:

"The first glycine-to-tryptophan substitution in the COL1A1 gene identified in a patient with progressively-deforming Osteogenesis imperfecta"

Oświadczam, iż w wyżej wymienionej pracy mój wkład w powstanie publikacji polegał na: zebraniu materiału badawczego i przygotowaniu danych klinicznych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy przedłożonej przez mgr Kingę Sałacińską, jako części cyklu publikacji do przeprowadzenia przewodu doktorskiego.

I. Michałus
.....
podpis

dr. n. med.
Izabela Michałus
specjalista pediatrii i neonatologii
1896973

.....
Iwona Pinkiewicz
(dane osobowe)

Łódź, dn. 30.10.2023

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji:

„The first glycine-to-tryptophan substitution in the COL1A1 gene identified in a patient with progressively-deforming Osteogenesis imperfecta”

Oświadczam, iż w wyżej wymienionej pracy mój wkład w powstanie publikacji polegał na: wykonaniu części laboratoryjnej.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy przedłożonej przez mgr Kingę Sałacińską, jako części cyklu publikacji do przeprowadzenia przewodu doktorskiego.

.....
I. Pinkiewicz
podpis

Łódź, dn. 30.10.2023r.

.....
Lena Rutkowska
(dane osobowe)
m. Długa 6/A/1
99-210 Niemcew

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji:

„The first glycine-to-tryptophan substitution in the COL1A1 gene identified in a patient with progressively-deforming Osteogenesis imperfecta”

Oświadczam, iż w wyżej wymienionej pracy mój wkład w powstanie publikacji polegał na: wykonaniu części laboratoryjnej.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy przedłożonej przez mgr Kingę Sałacińską, jako części cyklu publikacji do przeprowadzenia przewodu doktorskiego.

.....
Rutkowska
podpis


(dane osobowe)
prof. dr hab. n. med.

Łódź, dn. 21. 10. 2023

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji:

"The first glycine-to-tryptophan substitution in the COL1A1 gene identified in a patient with progressively-deforming Osteogenesis imperfecta"

Oświadczam, iż w wyżej wymienionej pracy mój wkład w powstanie publikacji polegał na: zebraniu materiału badawczego i przygotowaniu danych klinicznych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy przedłożonej przez mgr Kingę Salacińską, jako części cyklu publikacji do przeprowadzenia przewodu doktorskiego.


podpis

Prof. dr hab. n. med.
Danuta CHLEBNA-SOKOŁ
Specjalista Chorób Dzieci
i Medycyny Wieku Rozwojowego
4008427

Bilon Kopyński
(dane osobowe)

Łódź, dn. 03.11.2023

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji:

"The first glycine-to-tryptophan substitution in the COL1A1 gene identified in a patient with progressively-deforming Osteogenesis imperfecta"

Oświadczam, iż w wyżej wymienionej pracy mój wkład w powstanie publikacji polegał na: zebraniu materiału badawczego.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy przedłożonej przez mgr Kingę Sałacińską, jako części cyklu publikacji do przeprowadzenia przewodu doktorskiego.

[Podpis]
podpis

Domènec Saladina
93-355 4002
ul. Tużyńska 159/24
(dane osobowe)

Łódź, dn. 31.10.23

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji:

"The first glycine-to-tryptophan substitution in the COL1A1 gene identified in a patient with progressively-deforming Osteogenesis imperfecta"

Oświadczam, iż w wyżej wymienionej pracy mój wkład w powstanie publikacji polegał na: opracowaniu danych bioinformatycznych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy przedłożonej przez mgr Kingę Sałacińską, jako części cyklu publikacji do przeprowadzenia przewodu doktorskiego.


.....
podpis

Agnieszka Gach
95-010 Anielin Swędowski
Ul. Wypoczynkowa 24

Łódź, dn.27.10.2023

.....
(dane osobowe)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji:

"The first glycine-to-tryptophan substitution in the COL1A1 gene identified in a patient with progressively-deforming Osteogenesis imperfecta"

Oświadczam, iż w wyżej wymienionej pracy mój wkład w powstanie publikacji polegał na: pozyskaniu finansowania, korekcie manuskryptu i zaakceptowaniu jego ostatecznej treści.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy przedłożonej przez mgr Kingę Sałacińską, jako części cyklu publikacji do przeprowadzenia przewodu doktorskiego.

Agnieszka Gach
.....
podpis