



Instytut „Centrum Zdrowia Matki Polki”

Zakład Genetyki

93-338 Łódź; ul. Rzgowska 281/289

tel.: (0-42) 271-12-71; genetyka@iczmp.edu.pl

Kierownik: Dr hab. n. med. Agnieszka Gach, profesor ICZMP

Łódź, 16.09.2023

**Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii
medycznej**

mgr Pauliny Jakiel

p.t. „Podłoże genetyczne niezdefiniowanych form cukrzycy”

Promotor: prof. dr hab. n. med. Maciej Borowiec

Diagnostyka genetyczna cukrzycy monogenowej ma kluczowe znaczenie dla pacjentów i jest modelowym przykładem przełożenia wyników badań na praktykę kliniczną. Modyfikacja lub optymalizacja leczenia, poprawa opieki klinicznej, diagnostyka genetyczna u członków rodziny, zdefiniowanie ryzyka przekazania choroby potomstwu i w efekcie udzielenie pełnej porady genetycznej to niektóre z elementów znacząco wpływających na jakość życia pacjenta. W przypadku cukrzyc monogenowych innych niż cukrzyca noworodkowa, ze względu na późniejszy wiek zachorowania i kliniczne podobieństwo do cukrzycy insulinozależnej, wysunięcie podejrzenia choroby genetycznej i skierowanie pacjenta na badania jest trudniejsze, jednak rosnąca świadomość środowiska medycznego przekłada się na wzrost rozpoznań i liczby wykonywanych badań genetycznych. Wprowadzenie do rutynowej praktyki diagnostycznej badań opartych o sekwencjonowanie nowej generacji (NGS) zrewolucjonizowało diagnostykę wielu chorób, szczególnie tych o heterogennym podłożu genetycznym. Choć znanych jest już ponad 40 genów związanych z wystąpieniem cukrzycy monogenowej, nadal w około jednej trzeciej przypadków nie udaje się ustalić przyczyny genetycznej. Co więcej, nawet w przypadku wariantów w genach o udokumentowanym związku z chorobą, nierzadko mierzymy się z trudnościami interpretacyjnymi i decyzjami co do zakresu przekazywanej pacjentom informacji. Być może kategoryzację wariantów uda się

w nieodległej przyszłości zoptymalizować dzięki algorytmom opartym o sztuczną inteligencję. Jednak punktem wyjściowym interpretacji zawsze są i będą zasoby baz danych zmienności genetycznej, dlatego dzielenie się ze środowiskiem naukowym i klinicznym informacjami o nieodnotowanych wcześniej wariantach i ich związku genotypowo-fenotypowym jest podstawą do rozwoju coraz doskonalszych narzędzi bioinformatycznych i powinno być praktykowane w każdym laboratorium genetycznym.

Recenzowana rozprawa doktorska jest poświęcona poszukiwaniu nowych genów i ich wariantów potencjalnie związanych z genetyczną przyczyną cukrzycy monogenowych. Ogromne znaczenie kliniczne poprawnie zdefiniowanego podłoża cukrzycy, przy raportowanym w literaturze dużym niedoszacowaniu rozpoznań cukrzycy MODY, sprawiają że podjęty przez Doktorantkę temat jest bardzo aktualny i potrzebny w praktyce klinicznej.

Przedstawiona do oceny dysertacja ma typowy dla rozpraw doktorskich układ redakcyjny. Zawiera 95 stron maszynopisu (w tym spis treści, wykaz skrótów, 68 stron tekstu pracy, streszczenia w języku polskim i angielskim). Pracę cechuje tradycyjny podział na wstęp, cele pracy, materiał i metody, wyniki badań, dyskusję, wnioski, piśmiennictwo, oraz spis tabel i rycin. W pracy umieszczono 13 tabel i 47 rycin oraz 162 pozycji piśmiennictwa.

Dysertację otwiera „Wstęp”, w którym Doktorantka szczegółowo scharakteryzowała aktualny stan wiedzy nt. cukrzycy, w tym epidemiologii, zasad rozpoznawania oraz klasyfikacji choroby. W dalszych podrozdziałach wstępu Autorka omówiła zagadnienia cukrzycy monogenowych, ze szczególnym uwzględnieniem MODY-X o jeszcze nieustalonym podłożu genetycznym. W ostatniej części wprowadzenia Pani mgr Paulina Jakiel przedstawiła z dużą starannością i licznymi odniesieniami do piśmiennictwa wytypowane geny kandydackie, potencjalnie odpowiedzialne za rozwój cukrzycy MODY-X w aspekcie ich udokumentowanego zaangażowania w metabolizm węglowodanów i sekrecję insuliny z komórek beta trzustki.

W mojej ocenie wprowadzenie stanowi szczegółowe i rzetelne omówienie poruszanych zagadnień w świetle bogatego i aktualnego piśmiennictwa. Autorka w przystępny sposób pozwala czytelnikowi zapoznać się z problematyką, której dotyczy Jej rozprawa naukowa. Dodatkowo, starannie przygotowane na potrzeby wprowadzenia ryciny szlaków sygnałowych, ułatwiają zaznajomienie się z obszernym znaczeniem i plejotropowym działaniem kinazy mTOR. Wstęp czyta się z dużą przyjemnością, a jego lektura dowodzi, że Doktorantka ma bardzo dobre przygotowanie teoretyczne do realizacji podjętych celów badawczych.

Głównymi celami rozprawy doktorskiej Pani mgr Pauliny Jakiel była identyfikacja genów kandydackich i ich zmienności genetycznej, jako potencjalnych czynników odpowiedzialnych za wystąpienie cukrzycy monogenowej. Na podstawie piśmiennictwa oraz baz danych, do badań wytypowano 9 genów kandydackich: *MTOR*, *TBC1D4*, *CACNA1E*, *MNX1*, *SLC19A2*, *KCNH6*, *RFX6*, *NKX2-2*, *NKX6-1*. Po przeprowadzeniu szczegółowej i krytycznej analizy danych z piśmiennictwa medycznego, które opisane zostały w części „Wstęp”, Autorka założyła, że warianty genów kandydackich zidentyfikowane w grupie badanej z klinicznym

rozpoznaniem cukrzycy monogenowej, mogą wpływać na wystąpienie fenotypu cukrzycy MODY.

Cele pracy zostały sformułowane w sposób jasny i przejrzysty. Co warte podkreślenia, badania takie nie były dotąd przeprowadzone w populacji polskiej. Szeroki zakres analizy genetycznej i imponująca wielkość grupy badanej, wyselekcjonowanej spośród pacjentów, u których wykluczono obecność wariantów w znanych genach MODY, wskazuje na ogrom podjętej przez Doktorantkę pracy.

W rozdziałach „Materiał i metody” Doktorantka charakteryzuje grupę badaną, opisuje wykorzystany w badaniach materiał biologiczny, a także użyte do eksperymentów odczynniki i sprzęt oraz wykorzystane metody analizy bioinformatycznej i statystycznej. Do badania włączono 994 pacjentów z podejrzeniem cukrzycy monogenowej. Na pierwszym etapie analizy u wszystkich pacjentów z grupy badanej przeprowadzono sekwencjonowanie nowej generacji (NGS) i przeanalizowano panel 15 genów: *HNF4A, GCK, HNF1A, PAX4, HNF1B, NEUROD1, APPL1, KLF11, CEL, BLK, PDX1, ABCC8, KCNJ11, INS* i *WFS1*, o udokumentowanym znaczeniu w rozwoju cukrzycy monogenowej. Następnie dane uzyskane od pacjentów, którzy byli negatywni pod względem obecności wariantów patogennych w znanych genach, poddano ponownej analizie i poszukiwano potencjalnie sprawczych wariantów w dziewięciu genach, wytypowanych jako geny kandydackie. Kolejno, obecność zidentyfikowanych wariantów w genach kandydackich została potwierdzona sekwencjonowaniem metodą Sangera. W podrozdziale tym Doktorantka szczegółowo opisuje metody biologii molekularnej wykorzystane w pracy badawczej, jak: automatyczna izolacja DNA, sekwencjonowanie nowej generacji NGS, sekwencjonowanie metodą Sangera. Z dużą starannością opisane zostały poszczególne etapy pracy eksperymentalnej, jak i analiza bioinformatyczna z uwzględnieniem filtrowania wariantów.

Podsumowując tę część rozprawy stwierdzam, że dobór metod analitycznych, bioinformatycznych i statystycznych do badań jest właściwy. Na podkreślenie zasługuje także fakt zgromadzenia bardzo dużej grupy badanej, co było zapewne możliwe dzięki wielośrodkowej rekrutacji, ale przede wszystkim znakomitemu doświadczeniu w badaniach genetycznych nad cukrzycą monogenową Promotora Pracy Profesora Macieja Borowca i wysokiej renomie Zakładu Genetyki Klinicznej CKD. W mojej ocenie, ten rozdział dysertacji dowodzi, że Doktorantka wykonała ogromną pracę laboratoryjną, projektując testy molekularne, a następnie wykonując poszczególne oznaczenia, a także pracę naukową, opracowując i podsumowując wyniki badań przy zastosowaniu złożonych i zaawansowanych metod bioinformatycznych i statystycznych. Świadczy to o naukowej dojrzałości Autorki i jednoznacznie dowodzi Jej przygotowania do samodzielnego prowadzenia badań naukowych.

W pierwszej części rozdziału „Wyniki” Doktorantka dokonała analizy panelu 15 genów związanych z rozwojem cukrzycy monogenowej. Spośród 994 pacjentów u 377 (37,9%) zidentyfikowano patogenne lub prawdopodobnie patogenne warianty w znanych genach odpowiedzialnych za rozwój cukrzycy monogenowej. Kolejno Doktorantka opisuje wyniki reanalizy danych pod kątem obecności wariantów sprawczych w dziewięciu wytypowanych

genach kandydackich z sekwencjonowania 617 pacjentów, u których nie zidentyfikowano wariantów patogennych w 15 badanych genach. Przyjęta strategia pozwoliła na identyfikację trzynastu heterozygotycznych, potencjalnie sprawczych wariantów w genach kandydackich. W dalszej części sekcji „Wyników”, Autorka charakteryzuje zidentyfikowane warianty z uwzględnieniem obrazu fenotypowego probanta, segregacji wariantu w rodzinie, częstości w populacyjnych bazach danych, a także opisuje wyniki analizy bioinformatycznej i wskazuje klasę wariantu zgodnie z wytycznymi ACMG. Dla każdego wariantu zostały starannie przygotowane ryciny wskazujące lokalizację zmiany w obrębie genu oraz dokumentujące wynik sekwencjonowania NGS w formacie IGV i chromatogram z sekwencjonowania metodą Sangera. Rozdział zakończony jest zbiorczą charakterystyką kliniczną pacjentów, u których zidentyfikowano warianty w genach kandydackich.

W mojej opinii wyniki przedstawione są w sposób uporządkowany i logiczny, a dane kliniczne i rodowodowe są wystarczające do interpretacji znaczenia wariantów. Do tej części pracy miałabym dwie uwagi:

- 1. Choć tytułowym zakresem pracy jest badanie niezidentyfikowanych wcześniej uwarunkowań genetycznych cukrzycy, a podrozdział dotyczący wariantów w 15 znanych genach powiązanych z cukrzycą monogenową jest dodatkowym elementem rozprawy dokumentującym strategię rekrutacji zasadniczej grupy badanej, zabrakło mi odniesienia do opublikowanej już na ten temat pracy zespołu Zakładu Genetyki Klinicznej CKD.*
- 2. Nie znalazłam w pracy numerów zgłoszeń czy informacji o zamieszczeniu w ogólnodostępnych bazach typu ClinVar nowych wariantów SNV zidentyfikowanych w ramach recenzowanej pracy doktorskiej. Dzielenie się ze środowiskiem naukowym i klinicznym informacjami o nieodnotowanych wcześniej wariantach jest ważnym aspektem prowadzenia pracy badawczej. Rozwój baz danych zmienności genetycznej człowieka warunkowany jest bowiem zgłoszeniami z lokalnych laboratoriów na całym świecie. Każde zgłoszenie nowego wariantu ma szansę wpłynąć na interpretację wyników u kolejnych pacjentów, czy na coraz bardziej docenianą reanalizę wcześniej wygenerowanych danych. Co więcej, obecnie zamieszczenie danych genetycznych w dedykowanych ogólnodostępnych domenach jest wymogiem formalnym przed opublikowaniem manuskryptu w praktycznie każdym czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. Proszę Doktorantkę o wyjaśnienie, czy takie zgłoszenia zostały wykonane lub są zaplanowane.*

W „Dyskusji”, obejmującej 9 stron, Autorka przystąpiła do interpretacji uzyskanych rezultatów w odniesieniu do danych z piśmiennictwa. Doktorantka poddała dyskusji wyniki badań dotyczące wariantów w 15 analizowanych znanych genach związanych z cukrzycami monogenowymi i w genach kandydackich. Co ciekawe wysoką częstość występowania monogenowych form cukrzycy wynoszącą 37,9% w populacji polskiej porównać można do częstości raportowanej przez badaczy z USA i Kanady, podczas gdy dane z innych populacji europejskich wskazują na znacznie niższą częstość. W dalszej części warianty w genach

kandydackich zostały omówione w aspekcie roli kodowanych przez nie białek, ich znaczenia w biologii komórek beta i potencjalnym ryzyku rozwoju cukrzycy typu 2.

Dyskutując wyniki własnych badań Doktorantka zachowała stosowny krytycyzm i z dużą ostrożnością odniosła je do danych z piśmiennictwa. Autorka m. in. słusznie zauważyła, że badania dotyczące wariantów w genach kandydackich warto powtórzyć u większej grupy pacjentów, a w przypadku pacjentów niezdiagnozowanych panelowym NGS warto poszerzyć analizę o całoeksonową czy nawet całogenomową. Całą dyskusję kończy cenne podsumowanie, w którym syntetycznie ujęto najważniejsze osiągnięcia pracy. Na uwagę zasługuje też solidne przedyskutowanie ograniczeń badania, z jakimi mierzyła się Autorka rozprawy. Całokształt dyskusji dowodzi, iż Doktorantka wykazała się dużą dojrzałością naukową i potrafiła krytycznie i z dystansem spojrzeć na wyniki swojej pracy. Jestem przekonana, że wyniki zaprezentowanych w rozprawie badań, mają szansę na opublikowanie w dobrym czasopiśmie o wysokim współczynniku oddziaływania (IF).

Uzyskane w toku badań wyniki oraz ich analiza w oparciu o dane z ogólnodostępnych baz danych i piśmiennictwa były podstawą do sformułowania przez Doktorantkę czterech wniosków.

Wnioski zostały sformułowane poprawnie i w całości odpowiadają powziętym do realizacji celom. Co prawda sposób przedstawienia dwóch pierwszych wniosków bardziej przypomina krótką rekapitulację wyników niż próbę wyprowadzenia uogólnień ze szczegółowych wyników pracy, jednak zdaję sobie sprawę, że przy tak precyzyjnie zdefiniowanych celach, zwłaszcza wobec uzyskanych wyników, wyprowadzenie uogólnień nie jest łatwe.

Uzyskane wyniki Doktorantka omówiła w odniesieniu do szerokiego, trafnie dobranego piśmiennictwa, obejmującego łącznie 162 pozycje. Praca została napisana poprawną polszczyzną, z dbałością o szczegóły. Cechuje ją poprawność stylistyczna, składniowa, ortograficzna i interpunkcyjna, co sprawia, że czyta się ją z łatwością i dużym zainteresowaniem. W całej pracy znalazłam jedynie kilka błędów interpunkcyjnych czy błędów literowych (np. w opisie metody sekwencjonowania Sangera to chromatogramy, a nie chromatografy są graficznym zapisem rozdziału cząsteczek), co jest nie do uniknięcia przy redakcji tego rodzaju dysertacji. Tekst pracy uzupełniają i wzbogacają czytelne ryciny, wykresy oraz starannie przygotowane tabele. Sposób redakcji tekstu, tabel i rycin uważam za właściwy, a wszelkie drobne uwagi krytyczne pozostają bez wpływu na całościową, pozytywną ocenę pracy.

Na zakończenie recenzji chciałabym wyraźnie podkreślić, że rozprawę doktorską Pani mgr Pauliny Jakiel oceniam bardzo wysoko. Uzyskane w toku realizacji pracy rezultaty mają istotne znaczenie dla nauki, a także dla praktyki klinicznej. Pragnę zauważyć, że wyniki rozprawy stanowią rzeczywisty wkład w rozwój wiedzy w reprezentowanej przez Doktorantkę dziedzinie badań. Wymiar użyteczny przedstawionych w rozprawie badań jest nie do przecenienia, bowiem Autorka pracy na zawsze już zmieniła życie ponad 370 osób dotkniętych

cukrzycą, które często po latach niepewności i nieoptymalnego leczenia otrzymały diagnozę molekularną, a tym samym szansę na spersonalizowaną opiekę medyczną i lepsze życie.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Pauliny Jakiel spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom na stopień naukowy doktora określone art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 poz.1789) i zwracam się do Wysokiej Rady Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie Pani mgr Pauliny Jakiel do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wnioskuję do Rady Naukowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani mgr Pauliny Jakiel, z uwagi na wysoką wartość poznawczą wyników badań oraz ich duże znaczenie praktyczne.

z wyrazami szacunku

Agnieszka Gach

Dr hab. n. med. Agnieszka Gach, profesor ICZMP