

Prof.dr hab.n.med. Anna Latos-Bieleńska  
Katedra i Zakład Genetyki Medycznej  
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu  
Ul. Rokietnicka 8  
60-806 Poznań

Poznań, dnia 30.04.2023

## Recenzja

Rozprawy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Anny Chabros  
pt. „Patogenność mutacji w genie *GDAP1*”

Promotor: Prof.dr hab.n.med. Andrzej Kocharński

Promotor pomocniczy: Dr hab. n.med. Dagmara Kabzińska

Przystępując do oceny rozprawy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Anny Chabros, chciałabym wyrazić zadowolenie z powierzenia mi zaszczytnego obowiązku recenzenta - ze względu na to, że praca dotyczy polineuropatii dziedzicznych, a miałam przyjemność być przy początkach badań nad chorobą CMT w Polsce, kiedy Prof. Andrzej Kocharński podjął badania naukowe nad chorobą CMT1A w swojej pracy doktorskiej, a następnie badania naukowe nad tą grupą chorób dziedzicznych nadzwyczajnie rozwinął, co obserwuję z dużym zainteresowaniem i satysfakcją.

Praca została wykonana w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN. Na przeprowadzenie badań Pani mgr Katarzyna Chabros uzyskała zgodę Komisji Bioetycznej przy Okręgowej Izbie Lekarskiej w Warszawie, Uchwała Nr 30/17 z dnia 22 czerwca 2017 roku. Badania były finansowane ze środków NCN (grant OPUS 2016/23/B/NZ3/02035) oraz Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020 współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego (grant POWR.03.02.00-00-1028/17-00).

Praca jest w formie obszernej monografii liczącej 139 stron. Jednak zakres badań, mnogość zastosowanych metod, ilość uzyskanych wyników powoduje, że - nawet przy tak wielu stronach - jest jednak napisana syntetycznie. Zawiera kolejno: wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim, streszczenie w języku angielskim, Innowacyjność Rozprawy (1 strona), Wstęp (15 stron), Cele Pracy (1 strona), Materiały i Metody (20 stron), Wyniki (45 stron), Omówienie Wyników i Dyskusja (17 stron), Wnioski (1 strona), Suplement (6 stron), Spis Piśmiennictwa. Praca ma układ typowy dla rozpraw doktorskich na stopień naukowy doktora nauk medycznych. Proporcje między poszczególnymi częściami pracy są właściwe. Praca zawiera 30 rycin i 10 tabel. Jest napisana dobrym językiem.

Przystępując do oceny merytorycznej rozprawy doktorskiej, chcę podkreślić znaczenie tematu ocenianej pracy. Choroby kręgu Charcot-Marie-Tooth to heterogenna pod względem fenotypu i genotypu grupa chorób, w których występują zaburzenia włókien ruchowych, czuciowych i autonomicznych nerwów obwodowych. Choć badania podłoża molekularnego chorób kręgu CMT trwają od ponad 30 lat i piśmiennictwo na ten temat jest duże, to nawet przy zastosowaniu WES, rozpoznanie przyczynowe dotyczy tylko 45% chorych, a na wiele pytań dotyczących patomechanizmu i korelacji genotyp-fenotyp nie znaleziono do tej pory odpowiedzi. Częstość występowania CMT to 1:2500 osób, zatem cała grupa chorób kręgu CMT łącznie spełnia kryteria choroby rzadkiej (1:2000), a

poszczególne jednostki chorobowe są chorobami ultrarzadkimi. Chorzy z CMT mają doświadczenia wspólne prawie wszystkim chorym na choroby rzadkie, jak opóźnione rozpoznanie przyczynowe, ograniczony (w Polsce, na razie) dostęp do diagnostyki genetycznej objętej refundacją przez NFZ, postępująca niepełnosprawność i jej konsekwencje, ryzyko genetyczne przekazania patogennego wariantu genu potomstwu, brak skutecznego leczenia przyczynowego. CMT-GDAP1 spowodowana mutacjami w genie GDAP1 jest jedną z najcięższych polineuropatii uwarunkowanych genetycznie, a zarazem taką, o której niewiele wiadomo, jeśli chodzi o naturalny przebieg choroby i patogenezę.

To wszystko jest najlepszym uzasadnieniem dla uznania, że badania podjęte i rozwinięte w rozprawie doktorskiej Pani mgr Katarzyny Chabros, mają znaczną wartość i stanowią krok w kierunku nie tylko poprawy diagnostyki, określenia rokowania, poprawy poradnictwa genetycznego, ale także krok w kierunku opracowania terapii przyczynowej CMT. Taka właśnie myśl – uzyskania informacji dla wskazania potencjalnych celów dla terapii CMT-GDAP1 w przyszłości - przyświecała Doktorantce, wg jej własnych słów (Omówienie Wyników i Dyskusja).

W 15-stronnicowym Wstępie Doktorantka opisuje choroby kręgu Charcot-Marie-Tooth (CMT), począwszy od historycznego opisu choroby w 1886 roku. Opisuje objawy kliniczne, sposób dziedziczenia, podział na polineuropatie demielinizacyjne, pośrednie oraz aksonalne, opisuje również podłoże molekularne wg wymienionych grup chorób kręgu CMT. We Wstępie jest też podrozdział dotyczący perspektywy terapii eksperymentalnych w chorobach kręgu CMT, przedstawiający związane z tym trudności i nadzieje. To, że – jak pisze Doktorantka – jest blisko 400 badań klinicznych chorób kręgu CMT, świadczy o dużym zainteresowaniu tą grupą chorób na świecie i o aktualności podjętych przez Doktorantkę badań. Ostatnia część Wstępu dotyczy chorób kręgu CMT spowodowanych mutacjami w genie *GDAP1*. Są tu cztery typy polineuropatii autosomalnych recesywnych o wczesnym początku i ciężkim przebiegu oraz postaci autosomalne dominujące o późnym początku. Ze względu na rzadkość choroby, naturalny przebieg choroby nie jest dobrze poznany. Wstęp zamyka opis genu *GDAP1* i jego produktu białkowego. Wstęp świadczy o szerokiej wiedzy Doktorantki, jest znakomitym wprowadzeniem w zagadnienie i uzasadnieniem celów pracy doktorskiej.

Doktorantka przedstawiła trzy cele pracy, zostały one sformułowane realistycznie i ostrożnie. Pierwszym celem pracy była charakterystyka „tła genetycznego” u chorych, u których wykryto główny patogenny wariant sekwencji genu *GDAP1* w poszukiwaniu wyjaśnienia przyczyny różnego wieku wystąpienia i różnego nasilenia objawów choroby. Cel został osiągnięty. Drugi cel to próba opracowania modelu oceny patogenności mutacji genu *GDAP1* w oparciu o dobrane fenotypy molekularne i komórkowe. Chociaż ostatecznie nie było możliwe opracowanie takiego modelu, to podjęcie takiej próby ma dużą wartość dla praktyki klinicznej. Trzeci cel pracy dotyczył patogenezы molekularnej CMT-GDAP1, identyfikacji procesów komórkowych zaburzonych w wyniku mutacji genu *GDAP1* w modelu *in vitro* choroby CMT-GDAP1. Cel ten został osiągnięty.

Całość badań – od części klinicznej po badania *in vitro* – została bardzo dobrze zaplanowana i konsekwentnie przeprowadzona. Doktorantka objęła badaniami 14 pacjentów z 9 rodzin ze zidentyfikowanymi wariantami patogennymi genu *GDAP1*. Jest to bardzo duża grupa jak na tak rzadką chorobę, możliwa do zebrania dzięki temu, że do renomowanego Zespołu Chorób Nerwowo-Mięśniowych IMDiK PAN kierowani byli (i są nadal) pacjenci z całej Polski. Doktorantka przedstawiła sposób dziedziczenia i wiek wystąpienia pierwszych objawów choroby (Tabela 2) oraz rodowody pacjentów (Rycina 4). Na potrzeby badań Doktorantka stworzyła skalę genotypową, określając „siłę” poszczególnych wariantów, posługując się zaproponowaną przez siebie punktacją. Opracowała

również skalę fenotypową, uwzględniającą wiek wystąpienia pierwszych objawów, wyniki badań elektrofizjologicznych i neurologicznych oraz obecność dodatkowych objawów.

Na podkreślenie zasługuje różnorodność metod zastosowanych w pracy. Są to: praca na komórkach bakteryjnych i liniach komórkowych (HeLa i SH-SY5Y), transfekcja komórek ssaczych, wyciszanie ekspresji za pomocą siRNA, Western-blot, podstawowe metody badań molekularnych, WES, barwienie immunofluorescencyjne i mikroskopia konfokalna, transmisyjna mikroskopia elektronowa. Sposób przedstawienia metod wskazuje na dobrą ich znajomość przez Doktorantkę i świadczy o jej wszechstronności. Praca jest praco- i czasochłonna, robi naprawdę duże wrażenie.

Wyniki pracy są bardzo interesujące. Z perspektywy genetyka klinicznego doceniam przeprowadzenie sekwencjonowania całego eksomu (WES) u wszystkich pacjentów z badanej grupy i przeanalizowanie aż 154 genów związanych z CMT, co doprowadziło do odkrycia przez Doktorantkę, że chorzy z CMT-GDAP1 mają liczne dodatkowe rzadkie warianty w innych genach zaangażowanych w patogenezę chorób kręgu CMT. Wcześniej badań takich w CMT-GDAP1 nie prowadzono, Doktorantka jako pierwsza podjęła ten temat. W grupie badanych pacjentów Doktorantka wykryła średnio 3,6 dodatkowych rzadkich wariantów w „genach CMT”. Dwukrotnie więcej dodatkowych wariantów wykryła u pacjentów z mutacjami patogennymi w genie *GDAP1* dziedziczącymi się w sposób autosomalny dominujący niż u pacjentów z mutacjami dziedziczącymi się w sposób autosomalny recesywny. Z dużym zainteresowaniem zapoznałam się ze skalą fenotypową i z korelacją genotyp-fenotyp w CMT-GDAP1. Doktorantka wykazała, że dodatkowe mutacje w innych „genach CMT” wpływają na fenotyp i że pacjenci, u których takich mutacji jest więcej, mają cięższy przebieg choroby. Zbadanie „tła genetycznego” ma zatem dużą wartość dla praktyki klinicznej, tłumaczy niekiedy znaczne wewnątrzrodzinne różnice w przebiegu choroby i jest ważne dla poradnictwa genetycznego. Odkrycie Doktorantki dotyczące znaczenia tła genetycznego dla ostatecznego ukształtowania się fenotypu jest też ważne dla ogólnego zrozumienia korelacji genotyp-fenotyp w genetycznych chorobach człowieka, potwierdza obserwacje dotyczące innych chorób, że w genetyce klinicznej nie jest to zero-jedynkowa zależność między ewidentnie patogenną mutacją a fenotypem, ale wiele zależy także od wspomnianego tła genetycznego.

Niezwykle ważne było podjęcie przez Doktorantkę badań, jaki jest skutek mutacji w genie *GDAP1* na poziomie komórki. Badania były prowadzone na dobrze dobranych liniach komórkowych HeLa oraz SH-SY5Y. Oryginalnym odkryciem Doktorantki jest wykazanie, że mutacje w genie *GDAP1* kodującym białko mitochondrialne, wywołują zmiany w obrębie części trans aparatu Golgiego (TGH).

W Dyskusji Doktorantka umiejętnie omawia wyniki własnych badań w odniesieniu do danych z piśmiennictwa. Nie unika przedstawienia wątpliwości w odniesieniu do wyników badań własnych. Jednocześnie wskazuje przy tym kierunki dalszych badań nad CMT-GDAP1. Podobnie jak we Wstępie, zwraca uwagę bardzo dobra i wszechstronna znajomość tematu.

Pracę kończą 4 wnioski, odpowiadające celom pracy.

Piśmiennictwo liczy 118 pozycji, jest dobrze dobrane i aktualne, blisko 30 pozycji piśmiennictwa jest z lat 2020-2022. Praca zawiera liczne wartościowe tabele i ryciny, o czym wspomniałam wcześniej. Dobrym uzupełnieniem pracy jest Suplement. Zawiera tabele dotyczące poszczególnych pacjentów z podziałem wg obecności głównej mutacji w genie *GDAP1*, informacji o wariantach w „genach CMT” oraz przypisaną przez Doktorantkę punktacją. Jest też lista 154 genów

analizowanych przez Doktorantkę w badaniu „tła genetycznego” CMT-GDAP1. Większość z analizowanych genów jest o plejotropowym działaniu, wiele jest mi znanych z innych fenotypów.

Praca nie ma słabych punktów, a drobne rzeczy wymagające korekty, na które z obowiązku recenzenta zwracam poniżej uwagę, nie umniejszają jej wartości:

- Doktorantka używa najczęściej terminu „egzom”, miejscami „eksom”. Poprawny termin to „eksom”.
- Aktualnie unika się terminu „upośledzenie umysłowe”, zastępując go terminem „niepełnosprawność intelektualna”.
- Opisy tabel są pod tabelą, powinny być nad tabelą.
- Miejscami występują błędy interpunkcji.
- Do korekty jest Spis Piśmiennictwa: część cytowań jest niekompletnych (np. 4, 13, 50 i in.), nazwa choroby „Charcot-Marie-Tooth” jest miejscami pisana częściowo z małej litery (np. 2, 7) lub jeszcze inaczej zniekształcona (np. 18).
- Do korekty jest nazwa czasopisma w pracy autorstwa Doktorantki, wymienionej na str. 4.

Praca została częściowo opublikowana w dobrych międzynarodowych genetycznych czasopismach naukowych, została zatem już wcześniej oceniona i doceniona przez wymagających recenzentów międzynarodowych. Prace te to:

1. **Binięda K**, Rzepnikowska W, Kołakowski D, Kamińska J, Szczepankiewicz A, Nieznańska H, Kochański A, & Kabzińska D (2021) International Journal of Molecular Sciences 22(2), 914 (IF=6,208)
2. Kabzińska D, **Chabros K**, Kamińska J, & Kochański A (2022), Genes 13(9), 1546 (IF=4,141)

**Reasumując stwierdzam**, że praca doktorska Pani mgr Katarzyny Chabros dotyczy oryginalnego i ważnego zagadnienia i **nie tylko spełnia wszelkie wymogi** stawiane rozprawom doktorskim na stopień naukowy doktora nauk medycznych, **ale je przewyższa**. Zwracam się zatem do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN w Warszawie o **dopuszczenie mgr Katarzyny Chabros do dalszych etapów przewodu doktorskiego**. Jednocześnie z całym przekonaniem **wnoszę o wyróżnienie pracy** – ze względu na oryginalną koncepcję pracy, konsekwentne i logiczne poprowadzenie całości badań, umiejętnie połączenie danych klinicznych i badań o charakterze podstawowym, wniesienie nowych informacji do nauki światowej, duże znaczenie dla diagnostyki i poradnictwa genetycznego w CMT-GDAP1 oraz opublikowanie wyników w dobrych (IF > 6 i >4) czasopismach z Listy Filadelfijskiej.

Prof.dr hab.n.med. Anna Latos-Bieleńska