Instytut
Matki i Dziecka

Zakład Genetyki Medycznej
p. o. Kierownika Zakładu – Prof. dr hab. Jerzy Bal

Institute of Mother and Child
L'Institut de la Mère et de l'Enfant

Warszawa, 08/09/2021 r.

Recenzja osiągnięć Pani dr n. farm. Justyny Anny Karolak ubiegającej się o nadanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne wykonana na zlecenie prof. dr hab. Marka Ruchały - Kanclerza Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

1. Ocena aktywności naukowej, dydaktycznej i organizacyjnej

Pani dr n. farm. Justyna Anna Karolak jest absolwentką Wydziału Rolnictwa i Bioinżynierii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, gdzie w 2010 roku uzyskała tytuł magistra inżyniera biotechnologii na podstawie przedstawionej pracy magisterskiej zatytułowanej *Identyfikacja wariantów sekwencji DNA w genie COL4A12 w rodzinnie występującym stożku rogówki* (opiekun. prof. dr hab. M. Gajęcka). Badania dotyczące genetycznych uwarunkowań stożka rogówki kontynuowała w ramach dalszej pracy naukowej prowadzonej pod kierunkiem prof. dr hab. Marzeny Gajęckiej. Efektem prowadzonych badań była rozprawa doktorska pt. *Złożoność aspektów genetycznych w wieloczynnikowych chorobach narządu wzroku – stożku rogówki i wysokiej krótkowzroczności*, a następnie uzyskanie stopnia doktora nauk farmaceutycznych w 2014 roku.

Od 2012 roku dr n. farm. Justyna Karolak związana jest z Katedrą i Zakładem Genetyki i Mikrobiologii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. Podkreślenia wymaga fakt odbycia 2 staży zagranicznych (2014, 2017-2019) w prestiżowym ośrodku jakim jest Department of Molecular and Human Genetics w Baylor College of Medicine w Houston (USA), gdzie brała udział w pracach zespołu prof. dr hab. Pawła Stankiewicza dotyczących letalnych rozwojowych chorób płuc i określenia skali mozaikowatości w rodzinach z chorobami genetycznymi. Odbyła także 2 staże naukowe w Zakładzie Genetyki Medycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (kierownik Zakładu prof. R. Płoski).

Uzupełnieniem rozwoju zawodowego Pani dr n. farm. Justyny Karolak było ukończenie w 2014 roku Podyplomowego Studium z Zakresu Analityki Medycznej na Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu i uzyskanie tytułu diagnosty laboratoryjnego w 2018 r.

Zgodnie z analizą bibliometryczną (przygotowaną w grudniu 2020 roku), Habilitantka jest współautorką 31 publikacji naukowych, z czego 24 ukazały się po obronie pracy doktorskiej. Wszystkie publikacje, z wyjątkiem jednej pracy poglądowej i jednej pracy popularno-naukowej, zostały opublikowane w czasopismach z listy filadelfijskiej. Łączny IF wszystkich publikacji wynosi **125,561** (MNiSW 2414), są one często cytowane (liczba cytowań wg Web of Science: 298/258), indeks Hirscha wynosi 11. Od momentu przygotowania analizy bibliometrycznej, zostało opublikowanych, z współudziałem Habilitantki, kolejnych 7 prac oryginalnych dotyczących aspektów molekularnych chorób narządu wzroku i letalnych rozwojowych chorób płuc, **co świadczy o jej wysokiej aktywności naukowej**.

Na uwagę zasługuje aktywny udział dr n. farm. Justyny Karolak w międzynarodowych i krajowych konferencjach tematycznych, na których przedstawiała wyniki prowadzonych prac w formie wykładów

Instytut Matki i Dziecka
Zakład Genetyki Medycznej
tel. / fax (0 prefix 22) 32 77 361, 32 77 152, tel. centrala (0 prefix 22) 32 77 111 nr wewn. Sekretariat Zakładu 361, Kierownik Zakładu 200
e-mail: sekretariat.genetyki@imid.med.pl

(m.in. Annual Meeting of American Society of Human Genetics i European Human Genetics Conference) i prezentacji plakatowych. Jest współautorką łącznie 56 streszczeń: 38 na zjazdach międzynarodowych i 18 na zjazdach krajowych. Warto dodać, że za prezentacje wyników swoich prac naukowych była nagradzana w latach 2018 (ASHG), 2016 (PKG), 2013 (PKG) i 2011 (EVER). Uzyskała także 2 stypendia konferencyjne European Society of Human Genetics (2015 i 2013).

Pani dr n. farm. Justyna Karolak aktualnie jest kierownikiem grantu Sonata finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (2019/35D/NZ5/02896), wcześniej kierowała projektem finansowanym przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (NN 402 591740) oraz 4 projektami uczelnianymi Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Jej staże naukowe w Baylor College of Medicine wiązały się z realizacją badań w ramach projektów finansowanych przez National Institutes of Health (RO1HL13703, R01HD087292: kierownik prof. dr hab. Paweł Stankiewicz) oraz Narodowe Centrum Nauki (grant Harmonia 2013/10/M/NZ2/00283, kierownik prof. dr hab. Marzena Gajęcka). Była także wykonawcą w 4 grantach finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki lub Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

Prace naukowe Pani dr n. farm. Justyny Karolak były wielokrotnie nagradzane. Poza nagrodami z konferencji naukowych, otrzymała 2 Nagrody Naukowe Specjalne Rektora UMP (2016 i 2017) oraz nagrodę Polskiego Towarzystwa Genetyki Człowieka za najlepszą pracę doktorską (2016). Otrzymywała także stypendia dla doktorantów finansowane przez Uniwersytet Medyczny w Poznaniu (2014), Europejski Fundusz Społeczny (2013) i Narodowe Centrum Nauki (Etiuda, 2013-2014). **Na podkreślenie zasługuje także fakt otrzymania przez nią w czerwcu 2021 r stypendium Ministra Edukacji i Nauki dla wybitnych młodych naukowców.**

Uwagę zwraca także aktywność dydaktyczna Kandydatki na stopień doktora habilitowanego. Od 2012 roku prowadzi zajęcia organizowane przez Katedrę i Zakład Genetyki i Mikrobiologii Farmaceutycznej dla studentów UMP, w tym odpowiedzialna jest za pracownię magisterską dla studentów V roku Analityki Medycznej. Bierze także aktywny udział w opracowaniu materiałów dydaktycznych na potrzeby prowadzonych zajęć. Była opiekunką naukową **7 magistrantów** na kierunku Analityka Medyczna, w jednym przypadku pełniła także funkcję promotorki pracy. Jest promotorką pomocniczą w **3 przewodach doktorskich**, jeden z nich został zakończony we wrześniu 2020. Popularyzuje także widzę z zakresu ogólnie pojętej genetyki uczestnicząc m.in. w inicjatywach lokalnych podejmowanych przez studentów i diagnostów laboratoryjnych.

Dr n. farm. Justyna Karolak była także recenzentką **27** artykułów naukowych z zakresu biologii molekularnej i chorób genetycznych w czasopismach z listy filadelfijskiej (m.in. International Ophthalmology, Ophtalmic Genetics, Cornea, BMCOphthalmology). Jest lub była członkiem krajowych (PTGC) i międzynarodowych (ESHG, ASHG. EVER) towarzystw naukowych. Jest także członkiem Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu.

Poza realizacją prac naukowych odbyła także szkolenia tematyczne związane z jej aktywnością naukową (*3rd Course in Eye Genetics* – 2013, *RNA-Seq: strategie przetwarzania i interpretacji danych* – 2015), dydaktyczną (*Budowanie programu nauczania opartego na efektach kształcenia* – 2020) i potencjalnie wdrożeniową (*Własność intelektualna w procesie komercjalizacji wiedzy* - 2013).

2. Ocena osiągnięcia naukowego

Na osiągnięcie naukowe Pani dr n. farm. Justyny Karolak składają się wyniki badań przedstawione w 4 zespołowych publikacjach oryginalnych, 1 opisie przypadku i 1 publikacji poglądowej opublikowanych w latach 2019-2020. We wszystkich publikacjach dr n. farm. Justyna Karolak jest pierwszym autorem. Współczynnik oddziaływania (IF) dla wszystkich prac włączonych do osiągnięcia wynosi 41,780 (MNiSW: 840). Prace cytowane były 36 razy, co jest bardzo dobrym wynikiem biorąc pod uwagę krótki czas, jaki upłynął od ich publikacji. We wszystkich pracach, wkład Habilitantki w ich

powstanie był wiodący i polegał nie tylko na udziale w prowadzeniu badań laboratoryjnych i analizie uzyskanych danych, lecz również na sformułowaniu koncepcji pracy i redagowaniu manuskryptów.

Przedstawiony cykl publikacji skupia się na badaniach podłoża molekularnego rzadko występujących letalnych rozwojowych chorób płuc (LLDD) – zaburzeń rozwojowych, trudnych do zdiagnozowania w okresie prenatalnym, a prowadzących do śmierci noworodków z powodu niewydolności oddechowej. **Warto zwrócić uwagę na fakt, że cykl publikacji stanowiący osiągnięcie naukowe, to tylko część artykułów dotyczących tematyki LLDD, w których dr n. farm. Justyna Karolak była współautorem, a które zostały opublikowane przez zespół prof. P. Stankiewicza (Autoreferat: 5.2.3.1-5).** Celem prowadzonych badań było poznanie podłoża molekularnego LLDD oraz identyfikacja i charakterystyka nieprawidłowości genetycznych u pacjentów.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że **przedstawione wyniki badań prowadzone były w ramach współpracy wieloośrodkowej, międzynarodowej**, co umożliwiło scharakteryzowanie stosunkowo dużej grupy pacjentów z rzadko stwierdzanymi wadami rozwojowymi. **W pracach wykorzystywano najnowsze metody biologii molekularnej**, takie jak sekwencjonowanie eksomu / genomu i porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy umożliwiające identyfikację defektu molekularnego odpowiedzialnego za wystąpienie wad rozwojowych, oraz PCR emulsyjny (digital droplet PCR) lub technikę BDA (blocker displacement amplificaton), które pozwalają na wykrycie wariantów obecnych w niewielkiej frakcji komórek (mozaikowatość).

Trzy z przedstawionych prac (4.2.1-3) dotyczą złożonego podłoża genetycznego letalnych rozwojowych chorób płuc. U Badanych pacjentów zidentyfikowano defekt molekularny dotyczący genów *TBX4* lub *FGF10*, jednak ze względu na fakt, że mutacje w tych genach są przyczyną odpowiednio nadciśnienia płucnego, wad serca i/lub defektów układu kostno-szkieletowego oraz aplazji gruczołów łzowych i ślinowych i zespołu łzowo-uszno-zębowo-palcowego, poszukiwano modyfikatorów genetycznych odpowiedzialnych za odmienny fenotyp pacjentów z LLDD. Przebieg kliniczny nie zależał od typu mutacji – wady rozwojowe płuc obserwowane były zarówno u pacjentów z rozległą delecją 17q23.1q23.2 lub 5p12, jak i mutacjami punktowymi / wewnątrzgenowymi. Wystąpienie choroby nie zależało także od pochodzenia rodzicielskiego zidentyfikowanych zmian, co wyklucza efekt piętnowania rodzicielskiego. Wykazano natomiast, że u pacjentów z LLDD wzbogacona w warianty punktowe jest sekwencja regulatorowa genu *TBX4* (~200kb od miejsca startu transkrypcji). Lokalizacja zidentyfikowanych zmian pokrywa się z sekwencjami regulatorowymi – miejscami wiązania czynników transkrypcyjnych / innych białek regulatorowych specyficznych dla rozwoju płuca. Obecność wariantów niekodujących w sekwencji regulatorowej genu *TBX4* może wpływać na poziom jego ekspresji, co biorąc pod uwagę fakt, że produkt tego genu jest jednym z głównych czynników transkrypcyjnych obecnych w trakcie różnicowania się układu oddechowego, może się przełożyć na zaburzenia rozwojowe. **Uzyskane wyniki nie zostały zweryfikowane analizami funkcjonalnymi, jednak stanowią silną przesłankę do kontynuacji badań w tym obszarze.** Warto nadmienić, że jeszcze do niedawno w badaniach podłoża molekularnego wad rozwojowych skupiano się przede wszystkim na analizie określonych genów / regionów chromosomowych. Badania ostatnich lat wykazują jednak, że obecność wariantów genetycznych w niekodujących częściach genomu, może także stanowić przyczynę występowania zaburzeń rozwojowych. Prace dr n. farm. Justyny Karolak stanowią dobry punkt wyjścia do dalszych badań wpływu obecności wariantów w regionach regulatorowych na zmiany ekspresji genów, co może przekładać się na występowanie określonego fenotypu.

Ważne od strony poradnictwa genetycznego jest określenie przyczyny wystąpienia złożonych fenotypów, niecharakterystycznych dla konkretnej jednostki chorobowej. U jednego z opisanych przez Habilitantkę pacjentów o złożonym fenotypie (LLDD, małogłowie, spastyczność) zidentyfikowano powstały *de novo* wariant w genie *CTNNB1* oraz odziedziczony od bezobjawowego ojca wariant w genie *TBX4*. Po raz kolejny widać, że obecność wariantu w genie *TBX4* nie jest wystarczająca dla rozwoju LLDD i że musi istnieć dodatkowy czynnik modyfikujący fenotyp. Ze względu na fakt, że produkt genu *CTNNB1*

jest kluczowym elementem szlaku sygnałowego Wnt, który obok szlaku zależnego od FGF (TBX4), odpowiada za prawidłowy rozwój płuc, zasugerowano, że za wystąpienie wady płuc u w przypadku tego noworodka, odpowiedzialny jest synergistyczny efekt zaburzenia aktywności obu szlaków sygnałowych. Obserwacja ta dodatkowo dokumentuje fakt, że letalne rozwojowe choroby płuc, mają złożone podłoże genetyczne.

Kolejne 2 prace opisują rolę genu *FOXF1* w rozwoju dysplazji pęcherzykowo-włośniczkowej (ACDMPV). W pierwszej z nich dr Justyna Karolak charakteryzuje często występujący u pacjentów wariant c.691_698del (p.Ala231Argfs*61), który zlokalizowany jest w potencjalnym miejscu hot-spot dla powstawania mutacji. W drugiej wykorzystuje nowoczesne techniki biologii molekularnej do identyfikacji u rodziców chorych dzieci mozaikowatości somatycznej na bardzo niskim poziomie (zakres 0.03-19%). Udowadnia także że zjawisko mozaikowatości nie jest rzadkie i dotyczy 22% (4/18) badanych rodzin. Wyniki tych prac mają swoje praktyczne implikacje. Po pierwsze wskazują kierunek, w jakim powinna przebiegać diagnostyka molekularna u pacjentów z ACDMPV (rozpoczęcie analizy od najczęściej występujących mutacji – delecji 16q24.1 i delecji w obrębie sekwencji powtórzonych eksonie 1). Po drugie, częste występowanie mozaikowatości u rodziców ma przełożenie na poradnictwo genetyczne, a od strony diagnostycznej wskazuje na konieczność aplikacji czułych metod do identyfikacji nosicielstwa w rodzinach ryzyka genetycznego.

Niejako podsumowaniem wyników badań dr n. farm. Justyny Karolak jest praca poglądowa dotycząca algorytmu postępowania diagnostycznego u noworodków z objawami LLDD. Algorytm ten uwzględnia nie tylko kryteria kliniczne, lecz również wyniki badań histopatologicznych i wskazuje kierunek diagnostyki molekularnej w zależności od typu LLDD. Wskazuje także na możliwość aplikacji sekwencjonowania eksomu lub genomu u pacjentów bez zidentyfikowanego defektu genetycznego lub z mutacją w genie *TBX4* lub *FGF10*. Jest to pierwszy tego typu algorytm dla pacjentów z letalnymi rozwojowymi chorobami płuca, które ze względu na wysoką śmiertelność stanowią znaczny problem medyczny i społeczny.

Biorąc pod uwagę fakt rzadkiego występowania LLDD na uznanie zasługuje fakt przeprowadzenia badań na dużej grupie pacjentów, zaś wykorzystanie nowoczesnych metod biologii molekularnej umożliwiło lepsze poznanie podłoża molekularnego choroby, co przekłada się na algorytm postępowania diagnostycznego. W przyszłości wyniki tych i kolejnych badań mogą stanowić podstawę do opracowania ewentualnych strategii terapeutycznych, czemu będą również sprzyjać prace badawcze prowadzone przez dr n. farm. Justynę Karolak w ramach niedawno otrzymanego grantu Narodowego Centrum Nauki. **Moja ocena osiągnięcia naukowego Pani dr Justyny Karolak jest pozytywna.** Jedyne zastrzeżenie może budzić fakt jego prezentacji – jest on przedstawiony w formie omówienia poszczególnych publikacji, a wydaje mi się, że powinna stanowić jedną spójną całość – omówienie uzyskanych wyników.

3. Ocena pozostałej istotnej aktywności naukowej

Jak już wspomniałam w ocenie osiągnięcia naukowego, poza wskazanymi publikacjami, dr n. farm. Justyna Karolak jest również współautorką innych prac dotyczących podłoża molekularnego letalnych rozwojowych chorób płuca, które powstały na podstawie badań, również o charakterze analiz funkcjonalnych, prowadzonych przez zespół prof. P. Stankiewicza w Baylor College of Medicine. Także praca dotycząca mozaikowatości somatycznej u rodziców pacjentów z ACDMPV, jest częścią szerszego projektu realizowanego w tym samym zespole (NIH/NIHCD R01HD087292), a dotyczącego określenia skali mozaikowatości w rodzinach z chorobami genetycznymi. Warto podkreślić, że wyniki tych badań opublikowane były w wysoko punktowanych czasopismach Genetics in Medicine i Genomics, a Habilitantka w obu pracach jest jednym z pierwszych współautorów. Prace te mają także charakter aplikacyjny – w tej chwili standardem w badaniach nosicielstwa mutacji w rodzinach ryzyka genetycznego jest technika sekwencjonowania metodą Sangera. Przedstawione wyniki badań wskazują jednak na konieczność podjęcia dyskusji dotyczącej wdrożenia nowych, czułych technik do identyfikacji obecności wariantów patogennych w rodzinach ryzyka genetycznego.

bm

Na podkreślenie zasługuje również fakt, że dr n. farm. Justyna Karolak ma także duże osiągnięcia w zakresie badań naukowych dotyczących podłoża genetycznego chorób narządu wzroku. Tematyką tą zainteresowała się już w trakcie przygotowywania pracy magisterskiej i kontynuowała badania w ramach stażu doktorskiego na UMP. Prowadzone prace dotyczyły dwóch chorób wieloczynnikowych: stożka rogówki i wysokiej krótkowzroczności. We wczesnych badaniach Habilitantka skupiła się na badaniach asocjacyjnych, które umożliwiły powiązanie lub wykluczenie związku określonych *loci* z wystąpieniem jednego z badanych fenotypów. Niejako podsumowaniem prowadzonych badań jest praca poglądowa (5.2.1.5), zbierająca wyniki badań ośrodka poznańskiego i innych oraz wskazująca na możliwość wykorzystania metod wysokoprzepustowych w dalszych analizach podłoża molekularnego stożka rogówki. Znalazło to swoje odzwierciedlenie w późniejszych pracach naukowych dr n. farm. Justyny Karolak, w dalszym ciągu skupiających się na badaniu podłoża molekularnego chorób narządu wzroku, jednak wykorzystujących analizy transkryptomiczne i epigenetyczne. Na ich podstawie można stwierdzić, że etiologia stożka rogówki i krótkowzroczności jest złożona, zaś obserwowane zmiany dotyczą wielu szlaków sygnałowych i procesów komórkowych. Efektem prowadzonych badań jest 18 publikacji naukowych oraz szereg prezentacji na konferencjach krajowych i zagranicznych.

4. Podsumowanie i wniosek końcowy

Osiągnięcie naukowe Pani dr n. farm. Justyny Karolak stanowi podsumowanie badań, prowadzonych w ramach współpracy wieloośrodkowej, dotyczących złożonego podłoża rzadko występujących letalnych rozwojowych chorób płuc. Prace te mają nie tylko aspekt poznawczy, lecz także praktyczny – przekładają się na możliwość wdrożenia odpowiedniego algorytmu diagnostycznego (uwzględniającego analizę rodziców pod kątem mozaikowatości somatycznej), udzielenia odpowiedniej porady genetycznej, a w przyszłości mogą przysłużyć się opracowaniu nowych strategii terapeutycznych. W prowadzonych badaniach, nie tylko dotyczących LLDD, Habilitantka posługuje się nowoczesnymi technikami biologii molekularnej wykorzystującymi technologie omiczne: sekwencjonowanie genomu, analizę transkryptomu lub epigenomu, co świadczy o jej otwartości na nowe technologie i ich wykorzystanie do badań podłoża chorób rzadkich i wieloczynnikowych. Jednocześnie liczba opublikowanych prac i doniesień zjazdowych oraz udział w projektach naukowych krajowych (w tym kierowanie projektem SONATA finansowanym przez NCN) i zagranicznych, wskazuje na wysoką aktywność naukową Pani dr Justyny Karolak. Uzupełnieniem jej aktywności na polu naukowym, jest także praca dydaktyczna i pełnienie funkcji opiekuna / promotora prac magisterskich i doktorskich.

Podsumowując, osiągnięcia naukowe Pani dr n. farm. Justyny Karolak są znaczące i wpisują się w kierunek rozwoju badań dotyczących podłoża molekularnego zaburzeń rozwojowych i chorób wieloczynnikowych. W przyszłości prowadzone prace znajdą zapewne swoje zastosowanie w praktyce i przełożą się na sposób opieki nad pacjentami. **Dorobek, w tym osiągnięcie naukowe Habilitantki, oceniam pozytywnie.**

Mając powyższe na uwadze oceniam całokształt dorobku dr n. farm. Justyny Karolak **jako spełniający kryteria** wymagane dla nadania stopnia doktora habilitowanego, określonych w ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.). Tym samym wnioskuję o dopuszczenie Habilitantki do dalszych etapów procedury nadania jej stopnia doktora habilitowanego.

dr hab. n. med. Monika Gos, prof. IMiD
Zakład Genetyki Medycznej
Instytut Matki i Dziecka, Warszawa