

Ocena pracy doktorskiej mgr Kamili Rydzewskiej pt. „Analiza związku inwersji genetycznej 16p11.2 z predyspozycją do wystąpienia otyłości i nadwagi w populacji Polski”

Praca doktorska mgr Kamili Rydzewskiej, wykonana w Zakładzie Biochemii Klinicznej i Molekularnej, Wydziału Medycyny i Stomatologii, Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie pod kierunkiem dr hab. n. med. Jeremiego Simona Clarka i dr n. med. Thierrego van de Weteringa, ma postać obszernej monografii (123 stron), opracowanej zgodnie z wymogami przyjętymi dla prac eksperymentalnych w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu. Przed przystąpieniem do właściwej recenzji pracy doktorskiej sprawdziłem, czego można dowiedzieć się na temat Doktorantki w bazie *PubMed*. Znalazłem dziesięć publikacji z czego trzy publikacje, pod nazwiskiem Rydzewska z inicjałem K., które można przypisać Autorowi pracy doktorskiej, a które mają tytuły zbliżone do zakresu badań opisanych w pracy doktorskiej. Pierwsza z nich dotyczy wykorzystania techniki Monte-Carlo Kruskala-Wallisa, opartej na dopasowaniach Bernsteina w analizie zbiorów danych pochodzących z badań medycznych. Praca ta została opublikowana w 2023 roku w czasopiśmie *Scientific Reports*. Mgr Kamila Rydzewska jest również współautorem drugiej pracy opublikowanej w 2022 roku również w czasopiśmie *Scientific Reports*, w którym zamieszczono wyniki dotyczące identyfikacji czynników genetycznych związanych z liczbą posiadanych dzieci. Tematyka ostatniej pracy jest związana z oceną wpływu epidemii COVID-19 na pracę oddziałów ortopedycznych w Polsce. Jest to bardzo dobry start jak na początek kariery naukowej i po lekturze pracy doktorskiej jestem pewny, że p. mgr nie będzie miała problemów z utrzymaniem dotychczasowego tempa rozwoju naukowego. Dane uzyskane za pośrednictwem bazy *PubMed* znaczą, że wyniki badań zawarte w recenzowanej pracy doktorskiej nie zostały jeszcze pozytywnie zweryfikowane przez zewnętrznych recenzentów, i wzmaga w Recenzencie poczucie obowiązku rzetelnej pracy recenzenta.

Tematyka i cele recenzowanej pracy doktorskiej mieszczą się w głównym kierunku badań podstawowych dr hab. n. med. Jeremiego Simona Clarka i Jego współpracowników z Zakładu Biochemii Klinicznej i Molekularnej dotyczącym szeroko rozumianej genetyki w obszarze badań

populacyjnych. Pani mgr Kamila Rydzewska podjęła badania zmierzające do analizy związków pomiędzy inwersją 16.11.2 i zmiennością genów zawartych w tym obszarze a predyspozycją do występowania otyłości i nadwagi w populacji Polski. W pracy brakuje uzasadnienia podjęcia tematu, tym niemniej na podstawie lektury Wstępu wydedukowałem, że inwersje chromosomalne odgrywają istotną rolę w ewolucji poprzez ograniczenie procesu rekombinacji pomiędzy korzystnymi kombinacjami alleli. Do niedawna większość dowodów na ich znaczenie w ewolucji pochodziła od muchówek, których gigantyczne chromosomy pomogły we wczesnych badaniach cytogenetycznych. Powszechne zastosowanie nowych technologii genomicznych pozwoliło na odkrycie, że inwersje są wszechobecne w większości królestw roślin i zwierząt. Wyróżniamy inwersje paracentryczne, obejmujące jedno ramię chromosomu, lub pericentryczne, obejmujące region centromeru. Paracentryczne inwersje mogą segregować z nieinwersyjnymi układami w populacjach, a te polimorfizmy dostarczyły wczesnych dowodów na selekcję markerów genetycznych dzięki pionierskiej pracy Dobzhansky'ego i jego współpracowników z wykorzystaniem modelu *Drosophila pseudoobscura*. Dowody na selekcję polimorfizmów inwersyjnych uzyskano również w przypadku innych organizmów, w tym myszy i ludzi, co pośrednio pozwala na określenie genetycznych podstaw cech fenotypowych i podatności na choroby człowieka. Z niewielkiej ilości dostępnych informacji jasno wynika, że inwersje mogą mieć istotny wpływ na zdrowie człowieka. Inwersje są związane z hemofilią, zwiększonym ryzykiem występowania chorób neurodegeneracyjnych, chorób autoimmunologicznych i zaburzeń psychicznych. Mogą również predysponować do wystąpienia rearanżacji genomowych z negatywnymi konsekwencjami fenotypowymi u potomstwa. Istnieją również dowody na to, że inwersja 17q21.31 zwiększa płodność nosicieli i została ewolucyjnie, pozytywnie wyselekcjonowana u Europejczyków. Inwersje wpływają również na ekspresję genów. Jednak większość tych oddziaływań została powiązana z występowaniem tylko dwóch, najbardziej znanych i opisanych inwersji w genomie człowieka. Próby powiązania inwersji z ekspresją genów i zmiennością fenotypową w dużych zbiorach danych sekwencyjnych zostały ograniczone tylko do tych z pojedynczymi miejscami pęknięcia chromosomu, a do tej pory zidentyfikowano tylko kilka

takich inwersji. W związku z tym konieczne są szczegółowe badania genotypowe różnorodnych inwersji z wykorzystaniem baz danych zawierających wielotysięczną liczbę danych sekwencyjnych w celu określenia funkcjonalnego i ewolucyjnego wpływu inwersji. Jedną z chorób, której występowanie może być powiązane z inwersjami genetycznymi jest otyłość. Otyłość związana jest ze zwiększonym ryzykiem zgonu we wczesnym wieku i jest głównym czynnikiem obciążającym system zdrowia publicznego. Osoby otyłe są bardziej narażone na występowanie niezakaźnych chorób współistniejących, w tym cukrzycą typu 2, chorobami układu krążenia, nadciśnieniem tętniczym i niektórymi nowotworami. Jakość życia osób otyłych jest zmniejszona przez problemy mechaniczne wynikające ze znacznie zwiększonej masy ciała. Tempo wzrostu otyłości wydaje się spadać w większości krajów o wysokich dochodach, nadal rośnie w wielu krajach o niskich i średnich dochodach, a wskaźnik występowania otyłości pozostaje wysoki na całym świecie. Szczególnie niepokojący jest globalny wzrost otyłości wśród dzieci i młodzieży. Przyczyna szybkiego wzrostu występowania otyłości jest powiązana ze zmianami kulturowymi/środowiskowymi aczkolwiek nie brak głosów, że występowanie otyłości wynika z interakcji między czynnikami środowiskowymi i genetycznymi. Badania bliźniąt, rodzin po adopcji pozwoliły oszacować udział czynników genetycznych w zakresie od 40% do 70%. W konsekwencji analizy genetyczne mogą być wykorzystane do identyfikacji podstaw genetycznych mechanizmów fizjologicznych, które kontrolują i decydują o masie ciała. Taka identyfikacja mogłaby znacznie poprawić nasz wgląd w biologię otyłości i potencjalnie zidentyfikować nowe cele terapeutyczne. Przybliżyłoby nas to również nieco do "świętego Grała" - możliwości odejścia od nieudanej strategii leczenia otyłości "jeden rozmiar dla wszystkich" i przejścia do medycyny spersonalizowanej w leczeniu otyłości, chorób metabolicznych i innych chorób diet zależnych. Myślę, że obrona pracy doktorskiej mgr Rydzewskiej będzie dobrym forum na porównanie mojej i Jej wizji Uzasadnienia podjęcia tematu. Jeden jednoznacznie sformułowany cel pracy uznaję za ważny i w pełni uzasadniony w świetle danych literatury światowej przedstawionych w części teoretycznej (Wstęp). Postanowiono bowiem powiązać inwersję chromosomową 16p11.2 i zróżnicowanie polimorficzne genów występujących w tym regionie chromosomu z występowaniem otyłości i nadwagi w populacji

Polskiej. Jestem zaskoczony faktem umieszczeniem celu pracy w Streszczeniu. W mojej ocenie Cel pracy stanowi jeden z kluczowych elementów pracy doktorskiej i zasługuje na zamieszczenie jego w odrębnym podrozdziale.

Z dużym zainteresowaniem przeczytałem dobrze skonstruowany i napisany Wstęp pracy doktorskiej mgr Kamili Rydzewskiej. Wstęp ten można podzielić na dwie części – poświęcone kolejno inwersji genetycznej i jej znaczeniu w zróżnicowaniu populacyjnym oraz otyłości. W pierwszej części Autorka opisuje w kolejnych podrozdziałach charakterystykę inwersji, znaczenie ich w ewolucji człowieka oraz podaje przykłady najbardziej znanych w literaturze przedmiotu inwersji. W świetle cytowanych w tych podrozdziałach wyników osiągniętych przez innych autorów jednoznacznie wynika, że inwersje stanowią rodzaj wariantów strukturalnych genomu, które są trudne do analizy ze względu na ich zrównoważony charakter i lokalizację punktów przerwania szczególnie położonych w sekwencjach powtarzalnych. Jak dotąd tylko kilka inwersji zostało szczegółowo zbadanych w genomie człowieka, a obecna wiedza na temat ich możliwych skutków funkcjonalnych jest nadal ograniczona. Występowanie inwersji powiązано ze zmianami fenotypowymi i adaptacyjnymi u wielu gatunków w tym u człowieka. Inwersje hamują rekombinację u heterokarionów, a chromosomy o różnej orientacji ewoluują niezależnie, co prowadzi do różnych wzorców ekspresji genów. Ponadto inwersje mogą odgrywać rolę mutacji wywołujących choroby, zarówno poprzez bezpośredni wpływ na strukturę lub regulację genów na różne sposoby, jak i poprzez predysponowanie u potomstwa nosicieli inwersji. Odkrycia te podkreślają znaczenie ich włączenia do badań asocjacyjnych obejmujących cały genom. W drugiej części Wstępu mgr Kamila Rydzewska przedstawiła aktualną wiedzę na temat otyłości. W poszczególnych podrozdziałach Doktorantka opisała przyczyny i globalne skutki epidemiologii otyłości, konsekwencje jej występowania dla zdrowia osób otyłych oraz sposoby leczenia. Jak się okazuje częstość występowania otyłości gwałtownie wzrosła w ciągu ostatnich czterech dekad i jej występowanie wiąże się z chorobami współistniejącymi, takimi jak cukrzyca typu 2, nadciśnienie, dyslipidemia, niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby i zespół bezdechu sennego. Po przestudiowaniu tego podrozdziału lepiej zrozumiałem, że poszukiwanie podłoża genetycznego

otyłości jest w pełni uzasadnione. Stąd, projekt badań realizowany w pracy oceniam bardzo pozytywnie zarówno w perspektywie skali podjętych badań, jak też nowych wyzwań odważnie podjętych przez Promotorów i Doktorantki.

Materiał do badań stanowiła baza danych POPULOUS z Biobanku Uniwersytetu Łódzkiego zawierająca dane sekwencyjne 4000 osób opisana przez Doktorantkę w podrozdziałach 2.1 - 2.3. Mam tylko dwa pytania dotyczące zastosowanych metod technik badawczych, opisanych skrupulatnie na 20 stronach pracy, obejmujących metody bioinformatyki. Profesjonalne przedstawienie stosowanych metod jest najlepszym potwierdzeniem, że Autorka opanowała bogaty warsztat metodyczny. W jakim celu inkubowano próbki do sekwencjonowania po reakcji PCR „przez całą noc” (Str. 21). Co oznacza zwrot „wyrównanie wszystkich SNP” (Str. 23)? Nie jest również jasne na czym polega „wartość SNP” (Str. 24).

Po przestudiowaniu części teoretycznej i celów pracy mgr Kamili Rydzewskiej, w szczególności zaś po zapoznaniu się z warsztatem badawczym i metodami praktycznej realizacji założonych celów - przystąpiłem do studiowania rezultatów całej pracy w oczekiwaniu na interesujące wnioski końcowe. W rozdziale Wyniki Doktorantka przedstawiła uzyskane wyniki dotyczące analiz związku polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP) z występowaniem otyłości. Do analiz zostały wybrane SNP, które zlokalizowane są w inwersji (17 SNP) oraz w sześciu genach (*TFM*, *SH2B1*, *CCDC101*, *APOB48R*, *SPNS1* i *SULT1A4*) położonych w obrębie inwersji. Czy i jakie były inne kryteria doboru genów (poza lokalizacją)? SNP-y analizowano w czterech modelach dominującym, recesywnym, przewagi heterozygot i addytywnym za pomocą regresji logistycznej, liniowej, testów Chochrana i Fishera. Wyniki przeprowadzonych badań zaprezentowane zostały w formie 10 złożonych rycin oraz czterdziestu pięciu zestawień tabelarycznych. Na ich podstawie Autorka wskazuje na związek pomiędzy inwersją 16.11.2 a występowaniem otyłości tym samym potwierdzając słuszność swoich wcześniejszych założeń. Doceniając ogrom pracy włożony w opracowanie i analizę wyników za pomocą różnych metod bioinformatycznych uważam, że uzyskane wyniki wnoszą nowe informacje do dyskusji na temat podłoża genetycznego otyłości. Do

wyników, które dla mnie biologa są najważniejsze, oryginalne zaliczam identyfikację pięciu SNPów związanych z występowaniem otyłości. Opis wyników poszczególnych eksperymentów został przedstawiony rzeczowo, a ich staranna dokumentacja nie budzi moich zastrzeżeń. Wniosek końcowy sformułowany jest jasno. Zgodnie z definicją zamieszczoną w Słowniku Języka Polskiego wniosek to twierdzenie wyprowadzone ze zdań uznanych za prawdziwe. Tym samym użycie trybu przypuszczającego we wniosku nie jest poprawne. Zwięzła dyskusja wyników w odniesieniu do dobrze dobranej literatury naukowej, przeprowadzona jest we właściwy sposób. W zakończeniu oceny dodam, że Autorka w części teoretycznej oraz w dyskusji cytuje 154 pozycje literatury światowej i odnośników do narzędzi bioinformatycznych. W pracy zanotowałem też dużą liczbę błędów edytorskich.

Ponieważ z założenia recenzent tropi niedociągnięcia, błędy etc. dlatego poniższy fragment recenzji skupia się na tych właśnie sprawach.

- Nazwa łacińska jest pisana kursywą, nazwa rodzajowa od dużej litery, a epitet gatunkowy od małej litery (str. 4).
- Co oznacza termin odwrócone i nieodwrócone chromosomy (str. 4)?
- W mojej ocenie zmiana liniowego uporządkowania zasad DNA jest również zmianą zawartości genetycznej (str. 4), gdy na przykład dochodzi do złamania w miejscu sekwencji kodujących, promotorowych lub regulatorowych.
- Proszę o wyjaśnienie terminu „problemy strukturalne z mejozą” (str. 5).
- Proszę o uzupełnienie informacji na temat chorób genetycznych powiązanych z obecnością inwersji (str. 5).
- Nie jest jasne co oznacza trzecia zmienna (str. 5).
- Nie jest jasne w jaki sposób inwersja może wychwytywać dwa lub więcej alleli (str. 5). Prawdopodobnie chodzi tu o allele w dwóch lub więcej loci na tym samym chromosomie.
- Użycie zwrotu normalna populacja (str. 5) implikuje istnienie nienormalnej populacji. Proszę o podanie definicji „normalnej” i „nienormalnej” populacji.

- Proszę o podanie „nieważnych” genów regionu 17q21.31 genomu ludzkiego.
- Proszę o uściślenie definicji osób pochodzenia europejskiego (str. 8).
- Proszę rozwinąć pojęcie „genów o funkcjach regulacyjnych zarówno z bilansem energetycznym” (str. 9).
- Jakie było kryterium doboru genów położonych w obrębie inwersji chromosomu 16 do analizy w recenzowanej pracy doktorskiej (str. 9)?
- Co autorka rozumie przez pojęcie „ujemnej wagi” (str. 11) ?
- Bardzo ostrożnie używałbym pojęcia osób otyłych metabolicznie zdrowych (MHO). Zwrot ten faktycznie istnieje w leksykonie medycznym ale zgłaszana częstość występowania MHO jest bardzo zróżnicowana w populacjach, co prawdopodobnie wynika z braku powszechnie akceptowanych kryteriów definicji zdrowia metabolicznego i otyłości. Również przebieg i wartość prognostyczna MHO są przedmiotem gorących dyskusji w środowisku lekarskim. Podobnie jestem ciekawy opinii Doktorantki na temat otyłości jako choroby.
- Zwrot „poważna choroba” implikuje istnienie niepoważnych chorób (str. 19).
- Jaki był powód usunięcia jednego z 17 SNP wybranych do analizy dla inwersji chromosomu 16 (np. Tabela 12 i dalsze)?
- Co oznaczają wartości liczbowe zamieszczone w kolumnach zatytułowanych HWE?
- Jaka różnica jest pomiędzy wagą prawidłową a normalną?
- Dlaczego wyniki wartości BMI dla poszczególnych genotypów są podawane jako średnia a czasami jako średnia i mediana?

Powyższe uwagi/komentarze sprowokowane oryginalnymi i ciekawymi rezultatami i równie ciekawą ich interpretacją mają charakter dyskusyjny/polemiczny i niczym nie umniejszają mojej wysokiej oceny rozprawy doktorskiej mgr Kamili Rydzewskiej. W moim przekonaniu publiczna obrona pracy będzie dobrym miejscem na wymianę poglądów/dyskusję dotyczącą moich komentarzy. Wszystkie części rozprawy świadczą o wiedzy Autorki i Jej dojrzałości naukowej. Uważam, że rozprawa, jest oryginalnym osiągnięciem naukowym, wnoszącym nowe dane do

wiedzy o genetyce otyłości i odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim. Dlatego też chciałbym złożyć wyrazy uznania nie tylko dla Doktoranta, ale i dla Promotorów pracy. Wnoszę zatem do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Medyczne Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie zgodnie z Ustawą o Szkolnictwie Wyższym i Nauce o dopuszczenie mgr Kamili Rydzewskiej do dalszych etapów postępowanie w sprawie nadania stopnia doktora.

Lódź 01.07.2023

Ignac Papierz