

Prof. dr hab. Tomasz Popławski

Łódź, 10.07.2023

Zakład Mikrobiologii i Biochemii Farmaceutycznej  
Moduł Laboratoryjny Analizy Materiałów Biomedycznych  
MOLECO LAB - Centrum Badań Molekularnych Chorób  
Cywilizacyjnych  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

### Ocena pracy doktorskiej mgr Konrada Podsiadło pt. „Analiza związku mutacji nonsensownych z wybranymi fenotypami w populacji polskiej”

Zróżnicowanie alleliczne DNA w ogromnym stopniu przyczyniło się do rozwoju medycyny i kryminalistyki, zwłaszcza dzięki jego zastosowaniu w badaniach nad genami odpowiedzialnymi lub warunkujących podatność nosicieli na występowanie wielu chorób człowieka, a także w badaniach przesiewowych dotyczących identyfikacji nieprawidłowości chromosomalnych w nowotworach. Rodzaje wariantów genetycznych wykorzystywanych jako narzędzia w tych badaniach zmieniły się w ciągu ostatnich kilkunastu lat i można je podzielić na pięć głównych klas: RFLP (polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych), VNTR (zmienna liczba powtórzeń tandemowych), STR (krótkie powtórzenia tandemowe lub mikrosatelity), SNP (polimorfizm pojedynczego nukleotydu) i CNV (zmiennosc liczby kopii). Analiza powiązań genetycznych przy użyciu tych narzędzi pomogła zmapować i odkryć geny odpowiedzialne za setki chorób dziedzicznych. Ponadto stworzenie i udostępnienie społeczności naukowej międzynarodowej bazy danych SNP wraz z rozwojem platform do typowania SNP o wysokiej przepustowości umożliwiły przeprowadzenie badań asocjacyjnych w całym genomie. Za ich pomocą udało się zidentyfikować geny (lub warianty genetyczne) odpowiedzialne za występowanie wielu chorób lub związane z odpowiedzią na leki. Sekwencjonowanie DNA oraz analiza asocjacyjna są obecnie przedmiotem badań wielu laboratoriów na świecie. W przedstawionej do oceny pracy doktorskiej wykonanej pod kierunkiem dr hab. n. med. Jeremiego Simona Clarka w Zakładzie Biochemii Klinicznej i Molekularnej, Wydziału Medycyny i Stomatologii, Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego analizowano związki pomiędzy SNP skutkującymi mutacjami nonsensownymi a długością życia, płodnością i otyłością. Wiele dowodów potwierdza słuszność hipotezy, zgodnie z którą na długość życia człowieka ma między innymi wpływ czynnik genetyczny. Uważa się, że wpływ na długowieczność mają liczne SNP występujące w obrębie nieznanej, prawdopodobnie dużej liczby genów. Identyfikacja tych

SNP różniących się pod względem występowania u osób starszych (często stulatków) w porównaniu z osobami umierającymi młodymi potwierdza hipotezę, że niektóre allele mogą predysponować do długowieczności. Co ciekawe, te same geny długowieczności były związane z występowaniem różnych chorób związanych z wiekiem, takimi jak choroba wieńcowa, nadciśnienie tętnicze, udar i nowotwory. Podobnie jak w przypadku długowieczności, również i płodność, rozumiana jako liczba posiadanych dzieci zależy w dużym stopniu od komponentu genetycznego. Zmienność ludzkich zachowań i sukcesu reprodukcyjnego jest związana z ryzykiem choroby i ma głębokie implikacje psychologiczne, społeczne i ekonomiczne. Jest to widoczne przede wszystkim w występowaniu niepłodności, gdzie postęp w identyfikacji uwarunkowań genetycznych i mechanizmów leżących u jej podstaw pozostaje w tyle za innymi chorobami człowieka. Jednym z powodów takiego stanu rzeczy jest fakt, że dobór naturalny ogranicza częstotliwość występowania alleli obniżających płodność. Liczba urodzonych dzieci ma jeden z najwyższych stopni poligeniczności spośród wszystkich cech, co jest zgodne z komponentem genetycznym, na który silny wpływ ma selekcja negatywna. Badania genetycznych podstaw płodności może wyjaśnić biologiczne mechanizmy leżące u podstaw niepłodności. Loci związane z płodnością mogą działać poprzez szeroki wachlarz mechanizmów. Mogą mieć bezpośredni wpływ na biologię reprodukcyjną lub działać poprzez cechy, które przyczyniają się do wyboru partnera lub innych aspektów zachowania i osobowości. Na przykład allele związane z wyższym poziomem wykształcenia są związane z niższą płodnością w niektórych populacjach, odzwierciedlając związek między wyższym wykształceniem a starszym wiekiem rodzenia dzieci. Poligeniczna jest też otyłość, aczkolwiek zidentyfikowano również loci monogeniczne powiązane z występowaniem tej choroby. Warianty polimorficzne co najmniej 15 genów są przyczyną przypadków otyłości monogenowej, wynikającej głównie z niedoborów w szlaku sygnałowym leptyna-melanokortyna. Około dwie trzecie przypadków dziedzicznej otyłości można przypisać powszechnym wariantom DNA, podczas gdy rzadkie warianty wyjaśniają pozostałą część. Wraz ze wzrostem liczby wariantów związanych z otyłością obserwuje się malejącą wielkość efektu alleli, przy czym większość alleli zwiększających lub zmniejszających występowanie otyłości przyczynia się do zwiększenia masy ciała o zaledwie kilka gramów lub mniej. Allele promujące otyłość wywierają minimalny wpływ u osób o prawidłowej masie ciała, ale mają większy wpływ u osób ze skłonnością do otyłości, co sugeruje wyższą penetrację; nie wiadomo jednak, czy te większe rozmiary efektów poprzedzają otyłość, czy są spowodowane stanem otyłości. Szacujemy, że ryzyko genetyczne otyłości jest

uwarunkowane przez tysiące wariantów DNA, które sprawiają, że zapobieganie i leczenie genetycznie uwarunkowanej otyłości stanowi poważne wyzwanie.

Licząca 112 stron rozprawa doktorska Konrada Podsiadło ma klasyczny układ dysertacji na stopień naukowy doktora w zakresie dyscypliny Nauk Medycznych i przygotowana została z dużą starannością pod względem redakcji i edycji tekstu. Rozpoczyna się 20 stronicowym *Wstępem*, w kolejnych rozdziałach którego omówione zostały zagadnienia bardzo dobrze uzasadniające podjętą problematykę badań. Po krótkim wprowadzeniu w tematykę mutacji, w tym mutacji nonsensownych, w sposób wyczerpujący przedstawione zostały wyniki badań innych autorów dotyczące klasyfikacji, skutków mutacji nonsensownych i metod badań powiązań obecności mutacji z chorobami człowieka. Szeroki zakres prezentowanych we *Wstępie* zagadnień spowodował pojawienie się pewnych uchybień i nieścisłości. Numeracja Rycin jest niewłaściwa, prawdopodobnie Autor dodał Rycinę 1 na końcu redakcji tekstu, nie uwzględniając tej zmiany w tekście *Wstępu*. Polemizowałbym z podziałem mutacji na trzy klasy: substytucja, insercja i delecja. Wyróżniamy dwie klasy – substytucja i mutacje zmiany długości – stąd bardzo często genetycy traktują insercje i delecje jako taką samą mutację. Jest to uzasadnione, gdyż efektem tej klasy mutacji jest bardzo często przesunięcie ramki odczytu. Zbyt dużym skrótem myślowym jest przypisanie neutralnym mutacjom zmian na poziomie aminokwasów (Tabela 2). Powszechnie przyjętym w języku angielskim zwrotem jest pęknięcie DNA a nie jego rozpad (str. 13). W jaki sposób błędy w transkrypcji mogą indukować mutacje nonsensowne w DNA? Podobnie zbyt dużym skrótem myślowym jest przypisanie mutagenom chemicznym tylko roli czynników, które interferują z procesem replikacji DNA. Również twierdzenie, że szkodliwe mutacje nonsensowne występują najczęściej wymaga komentarza, jest bowiem niezgodne z obowiązującą obecnie molekularną teorią ewolucji. Rycina 9 jest nieczytelna.

Celem pracy była ocena powiązania obecności mutacji nonsensownych, które skutkują przedwczesną terminacją syntezy RNA na skutek pojawienia się kodonu STOP (PTC) a długością życia, płodnością i występowaniem otyłości. Cel pracy został jasno sformułowany, a kolejne, w logiczny sposób zaplanowane zadania badawcze, w pełni uzasadnione. Została powiązana częstość występowania 141 SNP PTC z długością życia, płodnością i otyłością. W badaniach wykorzystano bazę danych POPULOUS z Biobanku Uniwersytetu Łódzkiego zawierającą dane sekwencyjne 5600 mieszkańców Polski. Polemizowałbym ze stwierdzeniem, że baza ta zawiera dane tylko osób zdrowych (miedzy innymi otyłość jest zaliczana do chorób metabolicznych).

Badania przeprowadzono za pomocą bardzo szerokiego spektrum technik statystycznych obejmujących test Cohen'a, korelację Spearman'a, wyliczenie ilorazu szans, regresję liniową i logistyczną z wykorzystaniem platformy statystycznej R oraz innych, pomocniczych narzędzi bioinformatycznych. Test Cohen'a nie jest najlepszym wyborem do oceny wielkości efektu. Jest on krytykowany za błędy, brak odporności na wartości odstające i zmienność (tj. duże błędy próbkowania) przy naruszeniu przyjętych założeń statystycznych, dlatego warto jest poprzeć swoje wnioski za pomocą innych estymatorów wielkości błędu. Ponadto nie ma już powodu, by stosować poprawkę Bonferroni w pierwotnej wersji i na przykład metoda Holma (FWER) jest bardziej skuteczna niż korekta Bonferroni. Nowoczesna i adekwatna do poszczególnych zadań metodyka badań została bardzo precyzyjnie przedstawiona w rozdziale *Metody* i suplementie zamieszczonym na dołączonej płycie DVD.

Wyniki przeprowadzonych analiz zaprezentowane zostały w formie złożonych, prawidłowych pod względem merytorycznym i graficznym 14 rycin, 29 tabel. Rezultaty badań zostały właściwie zinterpretowane, a w rozdziale Dyskusja w kompetentny sposób skonfrontowane z wynikami innych badaczy. Uważam, że rozdział Dyskusja oraz Zastrzeżenia potwierdza znajomość literatury przedmiotu przez doktoranta i właściwy krytycyzm do wyników badań zarówno własnych, jak i danych literaturowych. W pracy brak jest sformułowanych wniosków, zamieszczony rozdział Podsumowanie nie zawiera wniosków. Myślę, że obrona pracy doktorskiej mgr Konrada Podsiadło będzie dobrym forum na przedstawienie wniosków potwierdzonych w uzyskanych danych analitycznych.

Przeprowadzone w szerokim zakresie analizy dostarczyły bardzo obiecujących z punktu widzenia medycznego wyników. Do najważniejszych w mojej opinii należy identyfikacja genu *ERV3-1* jako kandydata predysponującego do występowania otyłości, stanowiąc tym samym doskonałe wejście do badań biologicznych struktura/funkcja. Wykazano również powiązanie pomiędzy pięcioma polimorfizmami a długością życia oraz płodnością (rs186105 powinien być czwarty a nie piąty, co wynika z układu treści pracy – str. 62).

Należy podkreślić, że sama analiza asocjacyjna poprzedzona została żmudnymi pracami, których celem było filtracja i zestawienie danych, które to umożliwiły właściwą analizę asocjacyjną.

Podsumowując stwierdzam, że bardzo wysoko oceniam przedstawioną mi do recenzji pracę mgr Konrada Podsiadło. Bardzo wnikliwa analiza asocjacyjna dostarczyła oryginalnych

wyników o niepodważalnej wartości poznawczej. Do sukcesu Doktoranta i Promotora przyczyniło się zarówno zastosowanie właściwych narzędzi bioinformatycznych, jak i wieloaspektowa analiza asocjacyjna, poparta poprawnym stosowaniem metod statystycznych. Opiniowana praca w pełni spełnia wymagania stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora. Wnoszę więc do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Medyczne Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie zgodnie z Ustawą o Szkolnictwie Wyższym i Nauce o dopuszczenie mgr Konrada Podsiadło do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Tomasz Popiewski