

Gdańsk, 28 września 2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej
magister Konrada Podsiadła
pt. „Analiza związku mutacji nonsensownych z wybranymi fenotypami w populacji
polskiej”

Badania nad zróżnicowaniem allelicznym DNA w minionych kilku dekadach dostarczyły cennej wiedzy w medycynie na temat genów warunkujących występowanie wielu chorób człowieka, a także prognozowania możliwej odpowiedzi nosicieli określonych genów na leczenie. Badania dotyczące analizy wariantów genetycznych stały się również niezwykle ważną częścią kryminalistyki. Dzięki rozwojowi wysokoprzepustowych technik analitycznych możliwa była między innymi analiza wielkoskalowa wariantów genetycznych dotyczących genotypowania polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNPs; *single nucleotide polymorphisms*) w całym genomie i przeprowadzenie statystycznych ocen asocjacyjnych z różnymi parametrami klinicznymi. Ponadto, prawdziwym zapalnikiem dla prowadzenia licznych tego typu badań okazało się stworzenie i swobodne udostępnienie naukowcom z całego świata bazy danych SNPs. W ten aktualny nurt badań opartych na sekwencjonowaniu DNA i analizie statystycznej asocjacyjnej wpisuje się również przedłożona do oceny niniejsza praca doktorska.

Główne cele postawione w pracy doktorskiej dotyczą analizy możliwych związków pomiędzy SNPs powodującymi mutacje nonsensowne a wiekiem mierzonym długością życia, płodnością mierzoną liczbą dzieci i nadwagą/otyłością mierzoną wskaźnikiem masy ciała (BMI; *body mass index*). W pracy doktorskiej wykorzystano wyniki analizy próbek DNA izolowanego ze śliny od 5600 dawców uznanych - na podstawie przeprowadzonej ankiety - za zdrowych z kolekcji o nazwie POPULOUS - 6047 próbek DNA dawców z terenu całej Polski zebranych w latach 2010-2012 (w badaniu zarejestrowanym jako TESTOPEK) i przechowywanych w Pracowni Biobanku, Katedry Biofizyki Molekularnej, Uniwersytetu Łódzkiego.

Rozprawa doktorska mgr Konrada Podsiadła jest napisana w języku angielskim, ma typowy układ dla tego rodzaju opracowań, a proporcje pomiędzy poszczególnymi rozdziałami są odpowiednio zachowane. Układ redakcyjny jak i forma edytorska nie budzą istotnych zastrzeżeń. Praca liczy 113 strony i składa się z 6 rozdziałów z licznymi podrozdziałami. Tekst został wzbogacony licznymi rycinami i tabelami. Praca doktorska jest zakończona streszczeniem w języku polskim i angielskim. Wstęp rozprawy jest dobrym wprowadzeniem w tematykę badawczą, której dotyczy praca doktorska. Opisano dotychczasowe badania innych

autorów na temat zidentyfikowanych mutacji i skutków mutacji powiązanych z chorobami człowieka. Szczególną uwagę poświęconym mutacjom nonsensowym, uwzględniono również opis metod badawczych stosowanych w ocenach powiązań obecności mutacji z wybranymi cechami człowieka, w tym również z zakresu *Genome Wide Association Studies* (GWAS).

Po wstępie następuje rozdział z jasno wspomnianym powyżej zdefiniowanymi celami badawczym pracy doktorskiej. Omówione w kolejnym rozdziale metody są adekwatnie dobrane do podjętych zadań badawczych. Choć zarówno populacja POPULOUS jak i sposób pobierania materiału biologicznego do badań oraz metoda izolacji i sekwencjonowania DNA były opisywane w innych już opublikowanych rozprawach doktorskich i artykułach naukowych, wskazane byłoby dla porządku dokonanie skróconego opisu w tym zakresie materiału i metod oraz przywołanie stosownych referencji. Scharakteryzowano liczne sposoby obliczeń biostatystycznych z użyciem oprogramowań dla tego typu analiz: test Cohen'a, korelację Spearman'a, wyliczenie ilorazu szans, regresję liniową i logistyczną z wykorzystaniem *R statistical platform* (wersję 3.4) i innych wspierających genetyka narzędzi bioinformatycznych (haplo.stats, THESIAS, PLINK, VEGAS, GATES, GRASS, etc.).

Opis wyników w kolejnym rozdziale rozprawy doktorskiej przedstawiają zadania badawcze, które są prawidłową próbą odpowiedzi na przyjęte założenia i cele badawcze. Spośród analizowanych 500 000 SNPs w próbkach badanej populacji POPULOUS Autor rozprawy doktorskiej podejmuje analizę obecności mutacji nonsensownych, które skutkują przedwczesną terminacją syntezy RNA na skutek pojawienia się kodonu STOP (PTC; *premature termination codon*) i powiązania ich ze wspomnianymi parametrami: długością życia, liczbą dzieci i BMI. W tej części rozprawy można znaleźć liczne ryciny (14) i tabele (29), które podsumowują wykonane obliczenia, a także pozwalają dostrzec ważne detaliczne informacje pominięte w opisie wyników. Ostatecznie w badaniu przeanalizowano 141 SNPs typu PTC w próbkach DNA od 5095 pacjentów i stwierdzono, że 21 z nich wskazywało statystycznie znamienne związki z jednym z trzech badanych parametrów. Wydaje się, że najciekawszymi poczynionymi obserwacjami jest identyfikacja genu *ERV3-1* jako kandydata predysponującego do występowania otyłości oraz istnienie isotnego związku pomiędzy pięcioma rozpoznanymi polimorfizmami a długością życia i liczbą dzieci.

Dyskusja jest zwarta i klarowna, jest świadectwem biegłości wiedzy, którą zgłębił Doktorant w tematyce prowadzonych badań, co potwierdza 129 trafnie cytowanych w rozprawie pozycji piśmiennictwa, a także zdolności wyprowadzania syntetycznych wywodów z mnóstwa danych uzyskanych z różnych logistycznych modeli statystycznych. Doktorant potrafił odnieść się krytycznie do uzyskanych własnych wyników badań, a także wskazać w odrębnym podrozdziale w końcowej części dyskusji niektóre z potencjalnych przyczyn i ułomności, które mogły wpłynąć na wniosek końcowy pracy doktorskiej.

Praca doktorska jest przygotowana z dużą starannością, co nie oznacza, że Doktorant nie ustrzegł się pewnych błędów. Pod względem edytorskim: numeracja rycin jest nieprawidłowa, przypuszczalnie spowodowane nieuwzględnieniem dodania ryciny nr 1 w końcowym etapie edycji rozprawy, co utrudnia powiązanie tekstu z treścią rycin w całej rozprawie doktorskiej. Niektóre ryciny są nieczytelne, a całkowita nieczytelność ryciny 9 nakazuje rozwiązanie problemu poprzez odwołania czytelnika do materiału źródłowego.

W ocenie aspektów *stricte* merytorycznych rozprawy doktorskiej istotną ułomnością jest bardzo ograniczony zasób informacji klinicznej o populacji zrekrutowanej do kolekcji POPULOUS. W kontekście badań nad otyłością wskazane byłoby posiadanie informacji np. na temat rodzaju otyłości (androidalna czy gynoidalna ?), stylu życia, diety, panel badań laboratoryjnych, a także oprócz parametru BMI, również charakterystyki składu masy ciała, w tym ilości tkanki tłuszczowej. Bardziej krytycznie należałoby się odnieść - po analizie wyników własnych - do założonego na początku badania stwierdzenia (na podstawie zebranych ankiet od dawców składających się na populację POPULOUS), że baza zawiera dane osób wyłącznie zdrowych. Doktorant zidentyfikował dawców z nadwagą i otyłością, które generują szereg zmian patofizjologicznych opisywanych w zespole metabolicznym. W części dotyczącej oceny krytycznej wyników własnych brakuje rozważań nt. rzetelności podawanych danych w uzyskanych ankietach dotyczących płodności. Na ile fakt nie zgłaszania posiadania często potomstwa przez rodzica (zwykle dotyczy to mężczyzn) pozostającego w kolejnym związku małżeńskim/partnerskim może zmieniać wyniki uzyskanych badań? Skala zjawiska rozwodów w Polsce jest znacząca. Przykładowo, w roku 2012 odnotowano w Polsce 64,1 tys. rozwodów, co stanowiło 35,6 % liczby nowo zawartych małżeństw. Ponadto, warto uwzględnić, że na liczbę rodzących się dzieci (NEB; *number of children „ever” born*) wpływa wiele czynników takich jak: poziom świadomości potencjalnych rodziców, choroby (w tym zaburzenia neuropsychiatryczne), uwarunkowania ekonomiczne (np. poziom edukacji, rodzaj pracy zawodowej, dochód indywidualny i rodziny), i wreszcie – bardzo istotne – model kulturowy rodziny i z tym związana presja społeczna do posiadania potomstwa. Czy nie należałoby również uwzględnić tych czynników w odniesieniu do badań o charakterze GWAS dla badania przyczyn, które decydują o liczbie NEB?

Całość pracy oceniam bardzo pozytywnie. Mgr Konrad Podsiadło wykazał dobre przygotowanie teoretyczne, pełne opanowanie nowoczesnego warsztatu badawczego z bardzo dobrze dobranymi narzędziami biostatystycznymi i bioinformatycznymi zawierającymi elementy nowatorstwa oraz umiejętność krytycznej analizy uzyskanych wyników. Praca zawiera szereg elementów oryginalnych, które mogą być odnoszone zarówno do innych badań analizowanej bazy genomowej, ale także do innych metaanaliz z zakresu GWAS. Ze szczególnym uznaniem należy się odnieść do pracy Promotora i innych osób wymienionych przez Doktoranta w podziękowaniach rozprawy doktorskiej. Biorąc pod uwagę charakter i

zakres wykonanej pracy badawczej trudno sobie wyobrazić powstanie tego dzieła bez olbrzymiego wsparcia mentorskiego.

Po całkowitej ocenie przedstawionej pracy stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, t. j. Dz.U. 2023 poz. 742 z późn. zmianami., dotycząca nadawania stopni i tytułów naukowym. Wnoszę więc do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie o dopuszczenie mgr Konrada Podsiadło do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. n. med. Leszek Kalinowski