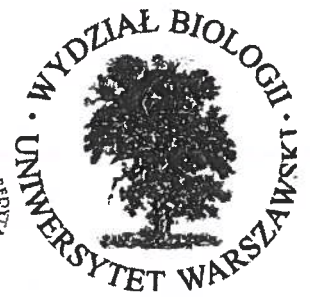




Instytut Genetyki i Biotechnologii  
UNIwersytet Warszawski  
WYDZIAŁ BIOLOGII  
ul. PAWIŃSKIEGO 5A, 02-106 WARSZAWA  
TEL: (+22) 592-22-44, FAX: (+22) 658-41-76  
<http://www.igib.uw.edu.pl>



Prof. dr hab. Ewa Bartnik  
tel.0048 22 592 22 40  
e-mail: [ebartnik@igib.uw.edu.pl](mailto:ebartnik@igib.uw.edu.pl)

Akceptuję  
M. J.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Piotra Gasperowicza pt. „Analiza wpływu zróżnicowania epigenetycznego na fenotyp – badania bliźniąt jednojajowych”

Promotor – Prof. dr hab. n. med. Rafał Płoski

Badania przyczyn chorób wieloczynnikowych – mających zarówno komponentę genetyczną jak i środowiskową – są trudne, spadające kosztów sekwencjonowania całogenomowego zdecydowanie ułatwiają analizę genetyczną, nie jest jednak jasne jak badać wpływ pozagenetyczny, i dość trudno jest znaleźć grupę kontrolną. Dość interesującym podejściem jest badanie metylomu – niewątpliwie metylacja jest zjawiskiem epigenetycznym, Pozostaje problem dostępnych u człowieka tkanek i grupy kontrolnej.

Standardowo badana jest krew, a dokładnie DNA białych krwinek. Są dane sugerujące, że z wiekiem metylacja może ulegać zmianom, i te zmiany niekoniecznie będą odbiciem badanego procesu chorobowego. Co więcej, przy chorobach wpływających na układ nerwowy krew nie jest idealnym materiałem do badania, choć często nie ma innych dostępnych tkanek.

Przedstawiona do recenzji praca polega na badaniu metylomu DNA izolowanego z krwi, ale badana grupa powoduje, że założenia pracy są bardzo interesujące. Badaną chorobą jest autyzm, a badana grupa to 3 pary jednojajowych bliźniąt płci męskiej niezgodnych pod względem diagnozy tej choroby. Nie jest podany wiek bliźniąt, u małych dzieci znane zjawisko dryfu metylomu z wiekiem raczej się nie przejawia, i wówczas istnieje możliwość podejścia do różnic epigenetycznych występujących w tej chorobie, dla której komponenta genetyczna jest całkiem wysoka – choć podawana rozpiętość zgodności zachorowań jest zadziwiająco wysoka – od 36-95%. Jednak nie mam jasności w jakim wieku były badane trzy

pary bliźniąt płci męskiej. Tytuł rozprawy jest bardziej ogólny niż sama treść, bo badany fenotyp dotyczył tylko ASD (autism spectrum disorder- zaburzeń ze spektrum autyzmu).

Praca ma klasyczny układ, i jest – co oceniam pozytywnie - krótka, jej najistotniejszą częścią jest analiza uzyskanych wyników sekwencjonowania, przeprowadzona bardzo szeroko.

Z obowiązku recenzenta chciałabym zwrócić uwagę na parę drobnych nieścisłości itp.

Na str. 10 „obecnie ta częstość szacowana jest na 1-2% (10-12)”; ale odnośniki 10-12 są z lat 2011-2014, więc raczej nie całkiem „obecnie”, bo kryteria diagnostyczne się zmieniają.

Na str. 11 „Częstość występowania ASD wśród rodzeństwa osób z autyzmem wynosi od 2,9 do 3,7% co stanowi ponad 100-krotne ryzyko w porównaniu z populacją ogólną” – ale czy istnieje jakaś podstawowa różnica pomiędzy częstością zachorowania (str. 10) a ryzykiem zachorowania? Na pytanie *autism risk in general population* jest odpowiedź *About 1 in 100 children has autism*. Proszę o wyjaśnienie.

Na str. 14 „jest katalizowany przez geny” – geny nie katalizują.

„cytozyna jest poprzedzona guaniną tworząc parę CpG” – chyba poprzedza guaninę?

str. 60 – Peng i wsp. brakuje odnośnika (tzn. liczby w spisie literatury).

Praca jest napisana dobrym językiem i wskazuje na świetną znajomość tematu. Autor musiał opanować złożone techniki analizy danych związanych z badaniem metylomu i korzystał z długiej listy publikacji – 152 pozycje, w tym 19 z ostatnich 3 lat. Brakuje mi jednak w tym spisie (choć ponieważ układ literatury jest wg. kolejności cytowania a nie alfabetycznie więc mogłam którąś z tych prac przegapić) odniesień do 4 stosunkowo nowych prac o bliźniątach jednojajowych i spektrum autyzmu, podaję tylko autorów, tytuł i datę, są to prace Imamura i wsp. (2020) *Genetic and environmental factors of schizophrenia and autism spectrum disorder: insights from twin studies*; Castelbaum i wsp. (2020) *On the nature of monozygotic twin concordance and discordance for autistic trait severity: a quantitative analysis*; Saffari i wsp. (2019) *RNA sequencing of identical twins discordant for autism reveals blood-based signatures implicating immune and transcriptional dysregulation* oraz Liang i wsp. (2019) *Genome-wide DNA methylation analysis reveals epigenetic pattern of SH2B1 in Chinese monozygotic twins discordant for autism spectrum disorder*.

Przedostania praca dotyczyła ekspresji genów w krwi – może by była możliwość porównania efektów metylacji na ekspresję genów, choć i w cytowanej pracy i tej rozprawie tkanka badana niekoniecznie musi być odzwierciedleniem tego, co się dzieje w mózgu pacjentów.

Analiza metylomu była przeprowadzona bardzo szeroko, dotyczyła – oddzielnie opisanych – siedmiu zagadnień – globalnego profilu metylacji, metylacji dinukleotydów CpG, genów, wysp CpG, promotorów, promotorów z bazy danych SFARI (Simons Foundation Autism Research Initiative) i promotorów genów ulegających piętnowaniu genomowemu. Ponadto doktorant przeprowadził analizę wzbogacenia funkcjonalnego – wskazującą na szlaki, które uległy wzbogaceniu – czyli mają związek z badanym zagadnieniem.

Mimo moich powyższych nielicznych uwag uważam, że praca jest bardzo dobra. Ogromna uzyskana ilość danych została starannie przeanalizowana. Ciekawe są informacje o genach wykazujących największe różnice między zdrowymi i chorymi bliźniętami, m. in. dla genów z bazy SFARI są to geny protokadheryny i jednego z receptorów dopaminowych. Warianty w tym genie są związane z ASD, acz cytowana praca jest z 2006 r. i ciekawe czy coś dalej ustalono. Dla wzbogacenia funkcjonalnego doktorant stwierdził różnice w metylacji m. in. szlaków kinaz białkowych aktywowanych mitogenami, szlaku sygnalizacyjnego dla oksytocyny, szlaków sygnalizacji wapniowej i szlak powiązań między neurotransmiterami i ich receptorami, Wszystkie te szlaki mogą mieć znaczenie w rozwoju tak złożonej patologii jak zaburzenia ze spektrum autyzmu, i praca ta wnosi ciekawe nowe dane. Wyniki badań nie zostały w momencie pisania tej recenzji opublikowane, ale sądząc po dotychczasowym wspólnym dorobku mgr Gasperowicza i prof. Płoskiego (26 prac w PubMed) jestem przekonana, że odpowiednia praca ukaże się niebawem. Mimo faktu, że badania epigenetyczne są bardzo popularne, liczba prac w PubMed dotyczących bliźniąt jednojajowych niezgodnych pod względem ASD jest niewielka, i nie znalazłam prac o epigenomie.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1689 z z późn. zm.). Zwracam się więc do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie pana mgr Piotra Gasperowicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa, 30.06.2023

  
Prof. dr hab. Ewa Bartnik

