



RECENZJA

**Rozprawy na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne
mgr Piotra Gasperowicza**

pt. „*Analiza wpływu zróżnicowania epigenetycznego na fenotyp – badania bliźniąt jednojajowych.*”

Promotor: Prof. dr hab. Rafał Płoski

Bliźnięta jednojajowe są prawie identycznymi kopiami genetycznymi i stanowią wręcz idealny model do badań, zarówno ewentualnego wpływu niewielkich zmian genetycznych na poziomie DNA na zaobserwowane zróżnicowanie fenotypu fizycznego, jak również wpływu czynników środowiskowych na fenotyp behawioralny w rozwoju ontogenetycznym. Badania z ostatnich lat wykazują, że genomy bliźniąt pochodzących z pojedynczej zapłodnionej komórki rozrodczej mogą zacząć się różnicować na poziomie genetycznym już na wczesnym etapie rozwoju zarodka. Badania te dotyczą m.in. poszukiwania różnic na poziomie genomu czy metylomu, jak również możliwości wpływu różnych czynników środowiskowych, zarówno w okresie embrionalnym i płodowym, jak w okresie postnatalnym. Niewątpliwie unikalną sytuacją jest gdy różnice pomiędzy bliźniętami są tak duże, że doprowadzają do objawów choroby u jednego z nich. Do tej pory poznano wiele mechanizmów genetycznych i epigenetycznych, które mogą mieć udział w procesie tak istotnej niezgodności fenotypowej.

Autor recenzowanej rozprawy skupił swoją uwagę na jednym z mechanizmów epigenetycznych, metylacji DNA i wyznaczył jako cel pracy zbadanie zmian w metylomie i ich potencjalny związek z predyspozycją do wystąpienia autyzmu.

We wstępie Autor przedstawił zagadnienia dotyczące zaburzeń ze spektrum autyzmu (ang. *Autism spectrum disorder*; ASD), które od wielu lat znajdują się w kręgu zainteresowań psychiatrów, psychologów i badaczy naukowych, ale z uwagi na złożoność objawów oraz nierzadko współlistnienie innych zaburzeń sprawiają duże trudności w poznaniu ich podłoża. Autor przedstawił w skrócie obecny stan wiedzy, w tym dane epidemiologiczne, kryteria rozpoznania oraz ich zmiany na przestrzeni lat, zgodnie z międzynarodowymi klasyfikacjami ICD-10, ICD-11 oraz DSM-5. W następnej kolejności zamieścił przegląd gromadzonych na przestrzeni lat informacji na temat możliwych przyczyn ASD, uwzględniając zarówno czynniki epigenetyczne, jak i środowiskowe, zamieszczając w tekście odpowiednie odnośniki

do źródeł naukowych. Ważnym podrozdziałem wstępu jest syntetyczny opis procesu i mechanizmów metylacji DNA jako czynnika epigenetycznego, który może mieć udział w podłożu ASD. Wstęp zamyka Autor dokładnym opisem zagadnień dotyczących tematyki bliźniąt jednojajowych i związanych z tym mechanizmem możliwych niezgodności fenotypowych, łącząc w ten sposób różne aspekty tego zagadnienia w spójne i logiczne wprowadzenie.

Przedłożona do oceny praca ma charakter monografii liczącej łącznie 85 stron tekstu, w tym 13 tabel i 22 ryciny. Układ pracy jest klasyczny, z podziałem na 8 rozdziałów z podrozdziałami, z zachowaniem odpowiednich proporcji. Praca zawiera: spis treści, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, cele pracy, materiał i metody, wyniki i dyskusję, wnioski, wykaz stosowanych skrótów, spis tabel i rycin, wykaz skrótów, piśmiennictwo oraz zgodę Komisji Bioetycznej WUM (KB/128/2014). Rozprawę zamykają wnioski. Bibliografia liczy 152 pozycje ułożone w kolejności pojawiania się w tekście, prawie wyłącznie anglojęzyczne, wśród których około 50% stanowią publikacje z ostatnich 10 lat.

Rozprawa doktorska była współfinansowana w ramach projektu naukowego OPUS (NCN) „Analiza wpływu zróżnicowania genomowego na fenotyp – badania bliźniąt jednojajowych” (2014/13/B/NZ5/00287, kierownik projektu dr Małgorzata Rydzanicz).

Oceniając rozprawę na stopień doktora nauk medycznych dokonam jej charakterystyki w zakresie:

1. wartości celu badawczego
2. poprawności metodycznej
3. znaczenia naukowego wniosków wynikających z przeprowadzonych analiz.
4. redakcji przedłożonej pracy

1. Wartość celu badawczego

Celem pracy była identyfikacja potencjalnych różnic w metylacji DNA pomiędzy grupą chorych i zdrowych bliźniąt jednojajowych w patogenezie zaburzeń ze spektrum autyzmu.

Cel ten był realizowany poprzez:

1. Określenie obecności różnic w metylacji DNA pomiędzy grupą badaną oraz kontrolną na poziomie globalnym, pojedynczych dinukleotydów CpG oraz określonych obszarów: genów, wysp CpG, promotorów, promotorów genów powiązanych z ASD na podstawie bazy SFARI, promotorów genów powiązanych z piętnowaniem genomowym
2. Określenie wpływu zidentyfikowanych zmian na procesy biologiczne poprzez ocenę wzbogacenia funkcjonalnego.

Cele pracy zostały przedstawione zwięźle i w sposób prawidłowy. Podział celu głównego na dwa mniejsze z zachowaniem ciągłości: cel nr 2 jest logicznym i naturalnym rozwinięciem celu nr 1. Formułując cele Autor wykazał się pewną dozą ostrożności wskazując je w sposób realistyczny.

2. Poprawność metodyczna

2.1 Materiał i metody

Grupa badana

Praca doktorska powstała na bazie materiału genetycznego (DNA) zgromadzonego na potrzeby ww. projektu naukowego NCN, w ramach którego zidentyfikowano 30 par monozygotycznych bliźniąt, u których występowały cechy fenotypowe różniące pomiędzy bliźniętami.

Obowiązywały następujące kryteria włączenia do badania:

- pisemna zgoda na udział w badaniach, bliźniąt lub ich prawnych opiekunów,
- potwierdzona monozygotyczność,
- fenotyp o potencjalnym podłożu epigenetycznym,
- dokumentacja medyczna potwierdzająca/charakteryzująca fenotyp
- możliwość pozyskania materiału genetycznego od obojga bliźniąt

Podstawowym kryterium włączenia pary bliźniąt do badania epigenetycznego był pozytywny wynik potwierdzający monozygotyczność uzyskany na podstawie analizy genetycznych markerów polimorficznych.

Na podstawie powyższych kryteriów ostatecznie do badania zakwalifikowano trzy pary bliźniąt z kategorii 'całościowe zaburzenia rozwojowe' z kodem F84 wg klasyfikacji ICD-10. Obecnie, wg kolejnej wersji klasyfikacji klinicznej (DSM-5) oraz wprowadzanej nowej klasyfikacji ICD-11 ta grupa chorób definiowana jest jako 'zaburzenia ze spektrum autyzmu', które zaliczane są do kategorii zaburzeń neurorozwojowych. Materiałem do izolacji DNA była krew obwodowa pobrana na antykoagulant EDTA.

Metody

Metody użyte do realizacji założonego celu zostały przez Autora wyczerpująco opisane, z podaniem nazw i zestawów odczynników oraz opisem wykorzystanej aparatury.

Pierwszym, kluczowym, etapem było ustalenie zygotywności bliźniąt (ZGM WUM). Uzyskany wynik potwierdzający monozygotyczność był następnie poddawany weryfikacji w Zakładzie Medycyny Sądowej WUM.

1. Proces izolacji DNA oraz ocena jakości, ilości i integralności uzyskanych preparatów, przed ich wykorzystaniem do badań, zostały przeprowadzone zgodnie z opisanymi standardowymi procedurami. Czystość każdego preparatu sprawdzano wykonując dwukrotny pomiar określonych parametrów.
2. Proces przygotowania bibliotek metylacyjnych składał się z kilku etapów, poczynając od pierwotnej biblioteki poprzez jej wzbogacenie w procesie hybrydyzacji, amplifikację w reakcji PCR oraz ocenę ilościową i jakościową wzbogaconej biblioteki.

3. Sekwencjonowanie zostało wykonane na aparacie Illumina Hiseq1500. Uzyskane dane zostały poddane procesowi weryfikacji jakościowej z zastosowaniem programu FASTQC, a po dalszej obróbce i analizie bioinformatycznej uzyskano pliki zawierające informacje o pozycji chromosomowej, pokryciu oraz poziomie metylacji dla każdej zsekwencjonowanej cytozyny, która przeszła filtr jakościowy. Pliki były punktem wyjścia do dalszych analiz.
4. Analizę wyników przeprowadzono z wykorzystaniem kilku bibliotek ze środowiska programistycznego „R” (RnBeads, WebGestaltR), co wskazuje na to, że Autor dobrze zna ten język i biegle porusza się w analizach z zakresu bioinformatyki.

Podsumowanie

Cały zakres stosowanych metod wskazuje, że Autor posiada kompleksową wiedzę i doświadczenie, zarówno w zakresie stosowania technik biologii molekularnej umożliwiających pracę laboratoryjną, jak i w zakresie analizy i procesowania danych bioinformatycznych. Ponadto stwierdzam, że przedstawione i zastosowane nowoczesne techniki i procedury analiz spełniają kryteria dobrej praktyki laboratoryjnej.

2.2 Wyniki

Dane uzyskane z sekwencjonowania zostały bardzo starannie przeanalizowane przez Autora, a wyniki i wnioski są interesujące w odniesieniu do tematu i założonych celów pracy. Jakkolwiek nie wszystkie analizy i porównania, które zostały przeprowadzone wykazały różnice między grupami nie jest to zaskakujące w pracy na materiale biologicznym. Należy przede wszystkim zwrócić szczególną uwagę na obszary, w których wykazano istotne różnice, tj. w grupie promotorów genów powiązanych z ASD (wg bazy SARFI) oraz wynikających z analizy szlaków sygnałowych. Dla tej pierwszej grupy jako najbardziej istotne wskazano geny protokadhedryny oraz geny receptora dopaminowego. Jako najbardziej istotne szlaki sygnałowe wskazano te, które były związane ze szlakiem sygnałowym oksytocyny, szlakiem rozwoju i prowadzenia aksonu, szlakami związanymi z synapsą glutaminergiczną i GABAergiczną oraz szlakiem oddziaływania ligandu neuroaktywnego z receptorem.

Wyniki zostały przedstawione w sposób przejrzysty i czytelny.

Tekst rozprawy został uzupełniony znaczną liczbą tabel i rycin, które zostały poprawnie zaadresowane i skomentowane. Uzyskane wyniki zostały poddane wyczerpującej dyskusji i skonfrontowane z bieżącymi doniesieniami naukowymi, jak również odniesione porównawczo do ważnych pozycji literatury opublikowanych wcześniej.

3. Wartość naukowa i praktyczna wniosków wynikających z przeprowadzonych analiz.

Oceniając całość pracy pragnę zwrócić uwagę na bardzo rzetelne i wnikliwe opracowanie uzyskanych wyników, zwłaszcza analizy genotyp-fenotyp. Praca bez wątpienia wyczerpuje znamiona pracy naukowej z zakresu badań podstawowych i ma dużą wartość naukową.

Podsumowując stwierdzam, że Doktorant sprostał podjętemu trudnemu wyzwaniu i osiągnął zakładane cele. Przedstawione wyniki badań mają dużą wartość naukową i mogą stać się punktem wyjścia do przeprowadzenia badań w znacznie większej skali (wieloośrodkowych?).

4. Redakcja przedłożonej pracy (uwagi recenzenta)

Oceniana praca doktorska została bardzo starannie przygotowana, zgodnie z wymogami dokumentacji naukowo-badawczej. Mocną stroną stanowią liczne tabele i ryciny. Praca została napisana poprawną polszczyzną.

Nie mam zastrzeżeń merytorycznych do recenzowanej pracy, ale mam kilka uwag o charakterze redakcyjnym, do uwzględnienia przed (spodziewaną) publikacją wyników:

- Pkt. 6.1 (str. 28): Autor omawia wyniki globalnego profilu metylacji, podczas gdy w kolejnym akapicie z tego samego punktu przechodzi już do omawiania wyników regionalnych. Logicznym rozwinięciem dla analizy regionalnej byłby pkt. 6.2, a poszczególne regiony powinny stanowić kolejne poziomy listy, 6.2.1., 6.2.2, ..., etc.
- Pkt. 6.1 (str. 29 i 30): Autor opisuje najpierw statystykę analizy różnicowej, a następnie procentową analizę dystrybucji poszczególnych *loci* w podziale na konkretne regiony. Dane te mogłyby zostać zaprezentowane w odwrotnej kolejności co byłoby bardziej logiczne z uwagi na przedstawione na początku pkt. 6.1 procentowe dane dotyczące globalnego poziomu metylacji.
- Opis Ryciny 5. (str. 24) oraz ryciny 11 (str. 42) wskazuje, że wielkość i intensywność koloru pokazanych na rycinach punktów bezpośrednio odzwierciedlają wielkość zbioru, po czym w nawiasie Autor rozszerza tę definicję i podaje, że jest to wartość proporcjonalna do liczby genów. Opis nie jest do końca klarowny i nie wskazuje jednoznacznie czym jest dany punkt, jak go interpretować oraz jaką wartość przyjmuje (bezwzględna czy względna).
- Tabela 6 (str. 33), tabela 7 (str. 34) oraz Tabela 9 (str. 41) zawierają kolumnę „stopień wzmocnienia”. Brak jest jednoznacznej informacji co dokładnie oznaczają wartości w tej kolumnie.
- W tabeli 12 (str. 51) zostały przedstawione różnice w poziomie metylacji dla 16 promotorów z bazy genów SFARI. W dyskusji Autor omówił możliwość biologicznego znaczenia różnicy dla dwóch pierwszych promotorów (protokadhedryny $\beta=0.2$ oraz receptora dopaminowego $\beta=0.11$). Zabrakło wyjaśnienia w dalszej części dyskusji czy pozostałe z 14 promotorów, o minimalnych różnicach w zakresie od 0.038 do 0.0017, mogą mieć jakiegokolwiek znaczenie biologiczne.

WNIOSKI KOŃCOWE

Biorąc pod uwagę aspekt naukowy pracy, w tym wartość merytoryczną wyników **oceniłam pracę jako spełniającą kryteria stawiane rozprawom na stopień doktora nauk medycznych** określone w art. 13 ust.1 Ustawy z dn. 14 marca 2003 r. „O tytule naukowym i stopniach naukowych oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” w związku z art. 179 ust 2 Ustawy z dn. 3 lipca 2018 r. „Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669).

Na tej podstawie **zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w Warszawie z wnioskiem o dopuszczenie mgr Piotra Gasperowicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**



Prof. dr hab. n. med. Krystyna H. Chrzanowska
Zakład Genetyki Medycznej
Instytut “Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”
Warszawa, al. Dzieci Polskich 20
E-mail: k.chrzanowska@ipczd.pl

Warszawa, 3 czerwca 2024 r.