

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr Łukasza Śledzińskiego pt. „Mechanizm zmian częstości alleli *CCR5Δ32*, *CCR2-64I*, *SDF 1-3'A* w polskiej i litewskiej puli genowej w ujęciu historycznym”.

Funkcjonowanie układu immunologicznego zależy od skoordynowanej odpowiedzi wrodzonej (nieswoistej) oraz nabytej (swoistej). Celem pracy realizowanej przez Doktoranta była analiza profilu zmian częstości alleli związanych z wrodzoną odpowiedzią immunologiczną w 16 populacjach historycznych. Drugim celem była ocena zjawisk demograficznych oraz mechanizmów odpowiedzialnych za powstawanie alleli związanych z odpowiedzią wrodzoną. Doktorant analizował trzy miejsca polimorficzne w genach *CCR5*, *CCR2-64I* i *SDF1* związanych z wrodzoną odpowiedzią immunologiczną, która bierze udział w zwalczaniu różnych infekcji oraz odgrywa niepośrednią rolę w chorobach autoimmunologicznych i nowotworach. Do wykonania badań Doktorant miał imponujący materiał badawczy tj. materiał kostny 681 osób z 39 stanowisk archeologicznych zlokalizowanych na obszarze współczesnej Polski i Litwy, datowanych w przedziale pomiędzy XL w.p.n.e. i XIX w.n.e. Doktorant wykorzystał do genotypowania alleli metodę Sangera, a uzyskanie wyników analizowano w oparciu o skład haplogrup mtDNA (identyfikowane na podstawie sekwencji HVRI). Dodatkowo zastosowana analiza biostatystyczna pozwoliła na sugestię mechanizmów odpowiedzialnych za skład alleli. Badania przeprowadzono co ważne podkreślenia zgodnie z procedurami związanymi z analizą kopalnego DNA tj. wszystkie prace odbywały się w clean room'ie. Dla wykluczenia zanieczyszczeń haplogrupy kopalnego DNA porównywano z haplogrupami osób biorących udział w pracach z kopalnym DNA.

Przedstawiona do oceny praca doktorska liczy 167 stron, oraz jedna strona oświadczenia. Ma budowę typową dla tego typu prac. Tekst uzupełniają oraz wzbogacają 17 tabel i 25 rycin. Piśmiennictwo liczy 345 pozycji!

WYKAZ SKRÓTÓW

W objaśnieniu skrótu:

NGS – *sekwencjonowanie nowej generacji*, *inaczej*: *HTS* – pojawia się kolejny skrót HTS, pewnie oznacza on high throughput sequencing. Skrót HTS – nie powinien zostać bez wyjaśnienia

WSTĘP

Wstęp rozpoczyna bardzo dobry i zwięzły opis problemów w badaniach archeologicznych dotyczących dziejów człowieka oraz jak od kilku lat wykorzystuje się nowoczesne metody biologii molekularnej w rekonstrukcji archeologicznej dziejów oraz relacji człowieka z innymi członkami społeczności jak również warunków panujących w środowisku na podstawie analizowanych sekwencji DNA. Doktorant zwięźle wyjaśnia wpływ patogenów na skład alleliczny genów, których produkty białkowe uczestniczą w obronie organizmu przed infekcją. Następnie wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z kopalnym DNA, a zwłaszcza z procesami degradacji DNA wywołanymi przez takie czynniki jak: wysoka wilgotność i temperatura otoczenia oraz dostęp do tlenu i obecność bakterii. Potem omawia pierwsze próby analizy kopalnego DNA oraz przełom związany z zastosowaniem PCR oraz wytypowaniem materiału kostnego oraz zębów jako zachowujących najlepszą jakość DNA. Kolejnym przełomem było zastosowanie dla analizy kopalnego DNA metody NGS, która umożliwiła poznanie całych genomów oraz dokładniejszą rekonstrukcję losów powstawania gatunku ludzkiego. Następnie opisuje warunki przechowywania preparatów archeologicznych po wydobyciu ze stanowiska jako jedne z kluczowych dla późniejszych analiz. W następnych stronach omawia degradację DNA zachodzącą *post mortem* oraz modyfikacje zasad w DNA co wprowadza błędy w odczycie sekwencji kopalnego DNA. W rezultacie procesów degradacyjnych wielkość kopalnego DNA jest zwykle długości 100-200pz. Potem Doktorant szczegółowo opisuje metody chemicznego i mechanicznego czyszczenia materiałów przed ekstrakcją, płynnie przechodząc do namnażania DNA, metody sekwencjonowania Sangera, kończąc omawia przewagę NGS. Doktorant wyczerpująco omawia również problem zanieczyszczeń egzogennym DNA oraz sposoby zapobiegania.

W kolejnym podrozdziale szczegółowo opisuje genetykę chorób zakaźnych. Zajmuje się ściśle relacją oraz wpływem patogenów na kształt puli genowej człowieka. Wspomina o Rewolucji neolitycznej (udomowienie zwierząt), która zwiększyła kontakty ludzi ze zwierzętami a to z kolei spowodowało rozwój nowych patogenów człowieka. Wpływ patogenów spowodował przewagę w populacjach alleli chroniących przed zakażeniem oraz zmniejszoną częstość alleli zwiększających podatność na infekcję. Doktorant wskazuje również na problem trudności w określeniu relacji ewolucyjnych między gospodarzem a patogenem z powodu wielogenowego modelu dziedziczenia podatności lub oporności na zakażenie. Zaznacza również wpływ wymiany puli genowych między różnymi osobnikami rodzaju Homo (neandertalczykami czy denisowianami). Doktorant wspomina również, że obok samych

patogenów, na podatność na infekcje mają wpływ czynniki środowiskowe (stres, dieta, warunki życia, warunki klimatyczne) oraz czynniki epigenetyczne gospodarza (wzór metylacji, ekspresja miRNA). Doktorant również opisuje ważne zjawisko ewolucji patogenów, która również wymusza ewolucję układu immunologicznego człowieka. Opisuje zjawisko mimikry genetycznej np. wirusa grypy A pochodzącego od ptaków, który w przeszłości pokonał barierę gatunkową poprzez zmiany w swoim materiale genetycznym. Wspomina o pandemiach wywołanych przez dżumę oraz hiszpańską grypę mających silny wpływ na skład alleliczny. Doktorant opisuje również ważne zjawisko, gdy odporność na infekcje może prowadzić do rozwoju chorób autoimmunologicznych i stanów zapalnych wywołanych nieadekwatną odpowiedzią układu immunologicznego, tzw. „koszt oporności”. Stan ten prawdopodobnie jest utrzymywany przez dobór stabilizujący.

Następnie Doktorant przechodzi do opisu miejsc polimorficznych związanych z wrodzoną odpowiedzią immunologiczną (CCR5 i CCR2 – które kodują dwa receptory chemokin o tej samej nazwie – oraz SDF 1 – kodujący chemokinę CXCL12) analizowanych w ramach pracy doktorskiej. Wymienione receptory oraz chemokina biorą udział w pierwszej linii obrony przeciwko patogenom oraz biorą udział w aktywacji mechanizmów swoistych, modulacji procesów zapalnych, patomechanizmie chorób autoimmunologicznych oraz nowotworów. I tak np. allele CCR5 Δ 32, CCR2-64I oraz SDF 1-3'A najczęściej omawiane są wspólnie jako mutacje chroniące przed infekcją HIV lub spowalniające progresję AIDS, z kolei CCR2-64I wykazuje właściwości ochronne względem HPV, a CCR5 Δ 32 oraz SDF 1-3'A zwiększają ryzyko infekcji nim. Doktorant wskazuje, że nie jest możliwe aby Wirus HIV ze względu na krótki okres czasu jaki oddziałuje na populację ludzką wywarł realny wpływ na pulę genową człowieka. Natomiast HPV towarzyszy Homo sapiens od początku jego istnienia, ze względu na powstanie w wyniku kontaktów seksualnych człowieka rozumnego z neandertalczykiem czy denisowianinem. Następnie Doktorant szczegółowo opisuje budowę, ekspresję i funkcje CCR5 Δ 32, CCR2-64I oraz SDF.

W kolejnym podrozdziale Doktorant wyczerpująco opisuje procesy ewolucyjne, omawia zjawisko dryfu genetycznego oraz wpływ doboru naturalnego oraz kojarzenia krewniaczego, przepływu genów, wielkości populacji oraz pomiar doboru naturalnego w populacji. Omawia zjawisko mutacji oraz tempo ich powstawania oraz wpływu jaki ma na kształtowanie puli genowej populacji. Doktorant dodatkowo opisuje znaczenie badania kopalnego DNA dla analizy doboru naturalnego na skład alleli w genomie człowieka (np. potwierdzenie istnienia silnego doboru pozytywnego wpływającego na geny kodujące zdolność człowieka do trawienia laktozy obecnej w mleku oraz odpowiedzialne za pigmentację włosów

i skóry. Doktorant krytycznie omawia potencjał symulacji komputerowych w odwzorowaniu siły i kierunku działania doboru naturalnego.

Generalnie wstęp to również kopalnia wiedzy dobrych praktyk laboratoryjnych, mających zastosowanie nie tylko w laboratoriach zajmujących się analizą kopalnego DNA. Sugeruję przygotowanie na ww. temat pracy przeglądowej.

Sumarycznie rzecz ujmując Wstęp jest napisany dobrze i przejrzyste oraz logicznie wprowadza czytelnika w zagadnienie i świadczy o monstualnym wyczerpaniu tematu przez Doktoranta oraz o jego gruntownej i szerokiej wiedzy. Jednakże jego objętość sumaryczna mogłaby być o 30% mniejsza.

CEL PRACY

Cel pracy doktorskiej jest bardzo jasno przedstawiony w pierwszym akapicie. Pozostaje jeszcze pytanie czy dwa kolejne akapity są opisem celów czy raczej metodyki wykonania badań i powinny zostać przeniesione do metod lub streszczenia.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy został poprawnie opisany i opatrzony dwoma mapami oraz tabelą lokalizacji stanowisk archeologicznych. Następnie Doktorant szczegółowo opisuje metodykę postępowania z materiałem, izolacji DNA, wykonania namnażania regionów badanych oraz sekwencjonowania Sangerowskiego do określenia genotypów. Doktorant dodatkowo wykorzystał metodę RFLP dla ustalenia przynależności do haplogrupy mtDNA H lub U. W dalszej części metodologicznej opisuje wdrożone różnego rodzaju (a opisane we wstępie) procedury oraz zasady pracy z materiałem kopalnym zmniejszające ryzyko zanieczyszczenia materiałem genetycznym pochodzącym od ludzi zajmujących się jego wydobywaniem, opracowaniem oraz badaniami genetycznymi będącymi przedmiotem niniejszej pracy doktorskiej. Świadczy to o poprawnie zaplanowanej i przeprowadzonej pracy laboratoryjnej oraz obrazuje bardzo duży wysiłek Doktoranta włożony w wykonanie niniejszej pracy. Metodologię wieńczy bardzo szczegółowy opis analizy statystycznej.

WYNIKI

Wyniki badań przedstawiono w sposób jasny i klarowny. Tekst jest bardzo bogato uzupełniony licznymi tabelami i wykresami. Odzwierciedla to systematyczny i bardzo duży wysiłek włożony przez Doktoranta w przedstawienie wyników.

Początek rozdziału poświęcony jest jakości uzyskanego DNA, jak i odsetkowi uzyskanych wyników. O jakości i trudności pracy z materiałem kopalnym świadczy uzyskanie wyników w 50% wszystkich analizowanych miejsc polimorficznych. Co jest logiczne wydajność izolacji DNA oraz uzyskania wyników była lepsza w próbkach pochodzących z najmłodszych populacji kopalnych. Przeprowadzone eksperymenty kontrolne świadczą o bardzo niskim odsetku zanieczyszczeń (1,91% próbek) materiałem genetycznym pochodzącym od badaczy. Świadczy to o wysokim standardzie prowadzonych badań począwszy od archeologów prowadzących wykopaliska a skończywszy na Doktorancie wykonującym procedury badawcze.

Analiza HVRI mtDNA wykazała brak ciągłości pomiędzy analizowanymi populacjami z regionów Polski i Litwy, np. w populacji Litwy współczesnej brak ciągłości genetycznej został wykryty w dwóch grupach: Litwa neolit oraz Litwa XII-XVI. W dalszej części Doktorant prezentuje częstości alleli oraz genotypów w badanych populacjach kopalnych oraz współczesnych dla obu krajów. Obliczono również dla każdej populacji kopalnej wskaźniki oceniające czy populacja znajduje się w równowadze Hardy'ego-Weinberga. Oceniono również stopień homozygotyczności analizowanych alleli. Doktorant przeprowadził również testy symulacyjne (ST) i test Waples'a (WT) w celu wykrycia w badanych populacjach dryfu genetycznego. Po wykonaniu ST i WT dla $N_e=10\ 000$, istotność statystyczną wykazały dwie populacje, które w teście Fishera znajdowały się na jej granicy – Litwa VIII-XI ($P=0.0617$) dla CCR5 Δ 32 oraz Siedlce ($P=0.0814$) dla CCR2-64I. Otrzymane przed Doktoranta wyniki sugerują, że zmiany częstości allelu CCR5 Δ 32 pomiędzy populacją kopalną a współczesną nie wynikają z działania doboru pozytywnego, ale mogą świadczyć o dryfie genetycznym. Natomiast w przypadku zmian częstości allelu CCR2-64I i SDF 1-3'A wyniki symulacji podają współczynniki doboru, które mogą być potwierdzeniem istnienia doboru negatywnego (oczyszczającego).

DYSKUSJA

Dyskurs naukowy jest prowadzony poprawnie. Doktorant sprawnie i płynnie dyskutuje swoje wyniki z cytowanym piśmiennictwem. Świadczy to o jej dobrej znajomości dyskutowanego tematu co potwierdza mnogość cytowanego piśmiennictwa. Doktorant umiejętnie łączy wiedzę na temat funkcjonowania układu immunologicznego, zwłaszcza odpowiedzi nieswoistej z analizami populacyjnymi oraz genetycznymi materiału kopalnego. Cała praca wymaga wielodyscyplinarnego podejścia z gruntowną wiedzą biologii molekularnej. Doktorant sprawnie opisuje wpływ patogenów jako najsilniejszy czynnik doboru naturalnego, mający największy wpływ na populacje ludzką w przeszłości. Obecnie można badać to zjawisko najbardziej kompleksowo poprzez analizę częstości alleli genów związanych z działaniem odpowiedzi wrodzonej w kopalnym DNA oraz porównaniem do obecnych częstości.

Doktorant na podstawie przeprowadzonych badań wyciąga wniosek, iż populacje historyczne na terenach Polski i Litwy, w większości przypadków, były małymi, izolowanymi grupami, z ograniczonym przepływem genów, co sprzyjało wsobności. Doktorant również rysuje wnioski, że spośród trzech omawianych miejsc polimorficznych, CCR5 Δ 32 wydaje się być allelem, na który nie wpływa dobór naturalny. Dodatkowo wskazuje, że zmiany częstości CCR5 Δ 32 w różnych populacjach i w różnych okresach historycznych wydają się być bezkierunkowe, a więc prawdopodobnie wywołane dryfem genetycznym. Natomiast częstości alleli w dwóch pozostałych polimorfizmach: CCR2-64I oraz SDF 1-3'A wydają się być spowodowane doбором naturalnym.

W następnej części dyskusji Doktorant zabiera nas w arcyciekawą podróż historyczną związaną z potencjalnym wpływem różnych patogenów na częstość CCR5 Δ 32 w populacjach ludzkich głównie zamieszkujących antyczną Europę. Ostatecznie nie ma jednoznacznego dowodu na wpływ patogenów w przeszłości na częstość CCR5 Δ 32, w związku z tym Doktorant umiejętnie interpretuje ten fakt jako popierający jego własny wniosek na korzyść dryfu genetycznego.

Następnie Doktorant dyskutuje częstość alleli dotyczącą dwóch pozostałych miejsc polimorficznych CCR2-64I i SDF 1-3'A. Zwraca uwagę na względnie małą liczbę opublikowanych prac w tej materii. Ostatecznie Doktorant wnioskuje na podstawie otrzymanych wyników symulacji oraz dostępnej literatury, że na częstość alleli CCR2-64I i SDF 1-3'A miał wpływ dobór negatywny. W następnej części Doktorant płynnie, a zarazem szczegółowo omawia stymulującą rolę polimorfizmów CCR5 Δ 32, CCR2-64I i SDF 1-3'A

w procesie zakażenia wirusem brodawczaka ludzkiego oraz rozwoju raka. Kończy konkluzją, iż *HPV mógł być czynnikiem doboru (przede wszystkim w przypadku CCR2-64I oraz SDF 1-3'A).*

Krytycznie się odnosi do metody symulacji w kontekście swoich wyników. Na zakończenie Doktorant słusznie wskazuje, że przedstawiona praca prezentuje jako jedyna do tej pory przyczyny zmian w częstości trzech alleli CCR5 Δ 32, CCR2-64I i SDF 1-3'A, które do tej pory głównie były dyskutowane w kontekście epidemii HIV/AIDS. Wnioskuje również o HPV jako potencjalnym czynnikiem doboru wpływającym na CCR5 Δ 32, CCR2-64I i SDF 1-3'A. W związku z powyższym można uznać temat jak i całą pracę za nowatorską. Na koniec słusznie zauważa, że uzyskanie wyników są przyczynkiem do dalszych badań dla wyjaśnienia znaczenia badanych polimorfizmów dla procesów koewolucji między patogenami a układem immunologicznym. Jednym z tematów przyszłych badań mogłaby być wpływ występowania polimorfizmów na częstość infekcji HPV oraz przebiegu tej infekcji.

WNIOSKI


Wnioski w sposób wyczerpujący odpowiadają na założone cele i świadczą o dobrej konstrukcji całej pracy. Prace uzupełnia poprawnie skonstruowane i zwarte streszczenie w języku polskim i angielskim. Dołączono również informacje o finansowaniu prac badawczych. Pracę wieńczy alfabetycznie uporządkowane 345 pozycji piśmiennictwa oraz Załącznik w postaci licznych tabel oraz wykresów.

Resumując należy podkreślić, że całość badań została bardzo dobrze zaplanowana i profesjonalnie przeprowadzona. Świadczy to o dobrej organizacji pracy oraz dobrym "warsztacie naukowym" Doktoranta. Dla realizacji zamierzonych celów doktorant musiał zastosować wszelkie procedury zmniejszające ryzyko zanieczyszczenia materiału kopalnego materiałem genetycznym badaczy oraz wykorzystał techniki biologii molekularnej. Wyniki zostały przedstawione za pomocą licznych ilustracji, tabel i wykresów.

W mojej ocenie rozprawa doktorska Pani mgr Łukasza Śledzińskiego spełnia wymogi stawiane tego typu rozprawom i zwracam się do Rady Naukowej Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie Pana mgr Łukasza Śledzińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 219 ustawie z 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz.U. z 2021r., poz.478).

Za powstałą pracą stoi ogrom wykonanej pracy, techniki biologii molekularnej oraz rzetelność pracy, dojrzały sposób prezentacji i wysoki poziom merytoryczny, duża wartość poznawcza wyników proponuję rozważenie przez Radę Naukową możliwości wyróżnienia pracy.


Artur Kowalik
2021.09.08