

Dr Dominik Strapagiel, prof. UŁ
Pracownia Biobank
Katedra Biofizyki Molekularnej
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgra Łukasza Jana Śledzińskiego, pt:

„Mechanizm zmian częstości alleli *CCR5Δ32*, *CCR2-64I*, *SDF 1-3'A* w polskiej i litewskiej puli genowej w ujęciu historycznym.”

Rozprawa doktorska Pana mgra Łukasza Śledzińskiego została wykonana na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Medycznego w Łodzi pod opieką promotorską Pana prof. dra hab. Macieja Borowca. Recenzowana rozprawa licząca 167 stron jest napisana w języku polskim i ma typową dla tego typu prac strukturę. Tekst uzupełniają liczne ryciny i tabele, uzupełnione na końcu pracy w materiały dodatkowe. Na uwagę zasługuje fakt, iż Doktorant w przedstawionym do oceny opracowaniu dołączył piśmiennictwo liczące blisko 350 pozycji.

Głównym celem pracy było określenie możliwego mechanizmu ewolucyjnego, który mógł mieć wpływ na obserwowaną częstość występowania trzech polimorfizmów w genach związanych z wrodzoną odpowiedzią immunologiczną, tj. *CCR5*, *CCR2* i *SDF* w historycznych populacjach zamieszkujących dzisiejsze tereny Polski i Litwy.

Zebrany i przebadany materiał kostny jest niezwykle cenny. Doktorant wykorzystał do badań liczną kolekcję, złożoną z 681 prób, reprezentujących 39 stanowisk archeologicznych datowanych od

okresu neolitu do nowożytności. Badania z użyciem kopalnego DNA są dużym wyzwaniem i wymagają szczególnych warunków pracy, celem ograniczenia do minimum ryzyka kontaminacji egzogennym DNA (operatora lub innych osób powiązanych z opracowaniem materiałów kostnych (np. archeolodzy, antropolodzy)).

Doktorant we wstępie nakreślił główną oś rozważań przedstawionych w pracy, tj. koewolucja człowiek-patogen jako przyczyna doboru naturalnego versus dryf genetyczny, z uwzględnieniem zjawisk demograficznych, na potrzeby której zaprojektował badania genetyczne i zaplanował wykorzystanie odpowiednich narzędzi analitycznych.

W kolejnych trzech rozdziałach, które również należy traktować jako wstęp, doktorant szeroko opisał wyzwania i ograniczenia jakie stoją przed analizą kopalnego DNA. Wyczerpująco przedstawił opisane w literaturze dane z zakresu genetyki człowieka w kontekście chorób zakaźnych z uwzględnieniem wspomnianej wcześniej koewolucji gospodarz-patogen oraz danych dotyczących znaczenia zmienności wytypowanych do badania genów. W ostatnim rozdziale teoretycznym opisano główne mechanizmy związane z procesami ewolucyjnymi.

Na podkreślenie zasługuje wnikliwe przeanalizowanie przez Doktoranta literatury odnośnie wyzwań, problemów i ograniczeń jakie stoją przed badaczami kopalnego DNA. Jako że, tematyka ta jest mi bliska z racji zawodowych zainteresowań - gorąco namawiam do opracowania tego rozdziału w formie pracy poglądowej, która może być niezwykle przydatna innym adeptom rozpoczynającym prace z tak trudnym materiałem. Drobnym korektom należałoby jednak poddać niektóre treści zawarte w tej sekcji:

1. W drugim akapicie na str. 16, dotyczącym hydrolitycznej degradacji DNA wkraść się błąd edytorski – zamiast możliwości przetrwania DNA w wiecznej zmarzlinie przez 800 lat, zgodnie

z przytoczoną literaturą można domniemywać, iż w takich warunkach DNA przetrwa przez kilkaset tysięcy lat.

2. W trzecim akapicie na str. 17 Doktorant sugeruje, że wyizolowane kopalne DNA charakteryzuje się typową długością fragmentów pomiędzy 100 a 200 par zasad (pz), co nie jest prawdą. Oczywiście fragmenty takiej długości są możliwe do wyizolowania, co zresztą jest podstawą tej pracy, natomiast autorzy cytowanej pracy wyraźnie wskazują, że dominują fragmenty o długości mniejszej niż 100 pz (Bouwmann and Rühli 2016).
3. W trzecim akapicie na str. 20 Doktorant sugeruje, że w przypadku analiz kopalnego DNA niezbędne jest powtarzanie badań dla tej samej próby minimum dwa razy. Zgadzam się, że w przypadku stosowania metod PCR i sekwencjonowania bezpośredniego jest to wskazane. Natomiast w przypadku stosowania metod NGS, typu *shotgun sequencing*, lub sekwencjonowania bibliotek otrzymywanych metoda wzbogacania, kontaminację można estymować w oparciu o jednokrotne przeprowadzenie analizy uzyskanych danych (np. w oparciu o analizę mtDNA, chromosomu Y – jeśli dotyczy).

Z jednej strony wszystkie rozdziały wprowadzające w tematykę prezentowanej pracy, zostały bardzo wnikliwie opracowane przez Doktoranta, co wyraźnie wskazuje na pieczołowitość i merytoryczne przygotowanie, z drugiej jednak jestem przekonany, że ta sekcja mogłaby być wyraźnie krótsza. To czego brakuje we wstępie, to precyzyjnego odniesienia się do charakterystyki stanowisk, z którego pochodzą materiały kostne, z uwzględnieniem, danych dotyczących datowania pośredniego lub bezpośredniego wykorzystanych materiałów kostnych, aby odnieść się do historycznych danych dotyczących różnych epidemii, które nękały średniowieczne populacje europejskie analizowanego regionu.

W rozdziale dotyczącym celów pracy, Doktorant jasno wskazuje, iż jednym z nich było określenie zmienności trzech wytypowanych do badań polimorfizmów w populacjach historycznych. Drugi cel opisany jest mniej przejrzysto, gdzie ukryto go niejako w opisie metod mających ocenić mechanizmy ewolucyjne, na podstawie danych na temat zmienności ocenianych wariantów. Ostatni cel natomiast jest zdecydowanie bardzo istotnym etapem weryfikacji i akceptacji pozyskanych danych i powinien być szczegółowo opisany w rozdziale materiały i metody.

W tym kontekście Doktorant przedstawia dane, wskazujące, że każda osoba mogąca mieć styczność z materiałem kostnym została przebadana genetycznie (zmienność regionu HVRI mitochondrialnego DNA) co wskazuje na dojrzałość naukową Doktoranta, który zadbał o to by wyniki uwzględnione w głównej analizie nie były obarczone błędem. Opis sposobu wykrywania próbek potencjalnie zanieczyszczonych egzogennym DNA wydaje się, że nie jest jednak całkowicie wyczerpany. Oceniony wzorec haplotypu i haplogrupy mtDNA jest w wielu przypadkach identyczny dla badaczy i badanych próbek – co oczywiście nie jest sytuacją zaskakującą, zakładając, że typową haplogrupą mtDNA dla Europejczyków jest H (Tabela 17, np. archeolog 5 i np. próbka J271 – Tabela 15.). Jak rozumiem właśnie takie próbki, które były powiązane z badaczem zostały usunięte. Być może rozszerzenie informacji dla poszczególnych badaczy, z uwzględnieniem trzech badanych polimorfizmów, pozwoliłoby zachować niektóre z usuniętych wyników. Do rozważenia jest również dodatkowa ocena wyników sekwencjonowania bezpośredniego, i ewentualne występowanie silnych sygnałów wskazujących na występowanie heterozygot w analizowanym mtDNA. Uwzględniając jednak fakt, że pozostając przy tak przyjętej metodyce, „utracono” jedynie niecałe 2% pozyskanych wyników (Tabela 6), tak rygorystyczne podejście doktoranta nie wpłynęło istotnie na utratę cennych danych w analizie.

W rozdziale dotyczącym opisu stosowanych materiałów i metod Doktorant bardzo przejrzysto i wyczerpująco opisał wykorzystane metody analityczne, z uwzględnieniem reżimu typowego dla laboratoriów badających kopalne DNA, począwszy od opracowania materiału kostnego i izolacji DNA poprzez przeprowadzone analizy genetyczne. Jest to potwierdzenie zdobytej i zaprezentowanej przez Doktoranta we wstępie wiedzy eksperckiej w tym zakresie. Opis metod analizy danych jest bardzo rozbudowany i ponownie wskazuje na pracę włożoną przez Doktoranta w przygotowanie rozprawy. Jedną z uwag do tego rozdziału jaką mogę podnieść jest wyraźny brak informacji, z jakich ośrodków współpracujących pozyskano materiał badawczy.

Wyniki prac badawczych Doktoranta zostały omówione w rozdziale siódmym, w sposób przejrzysty, zarówno w formie opisowej, graficznej jak i tabelarycznej. Doktorant wykazał się umiejętnością krytycznej i wyważonej oceny uzyskanych wyników. Uzyskana wydajność izolowania kopalnego DNA i oceny wariantów mtDNA i badanych polimorfizmów jest typowa dla tak zachowanego materiału genetycznego. Analiza F_{ST} dla wariantów wykrywanych w analizowanym fragmencie HVRI potwierdzają autentyczność uzyskanych wyników. Wyraźna odmienność osobników neolitycznych od pozostałych jest już poparta wieloma opublikowanymi pracami z tego zakresu. Interesującym wynikiem jest wysoka wartość F_{ST} dla osobników ze stanowiska Kałdus w porównaniu do stanowisk Rogowo, Linowo, Ostrowite, Cedynia, gdzie z wyjątkiem stanowiska Linowo, mamy do czynienia z podobnym datowaniem próbek. Być może zaobserwowana odrębność tej populacji na podstawie prezentowanych danych, wymagałaby pogłębienia analiz, w kontekście zróżnicowania genetycznego badanych populacji, co zresztą Doktorant sugeruje w podsumowaniu swojej pracy.

W dalszej części rozdziału Doktorant prezentuje wyniki analiz mechanizmów ewolucyjnych, z uwzględnieniem ograniczeń wynikających z liczebności osób z poszczególnych stanowisk archeologicznych i dostępności wyników analiz miejsc polimorficznych. W nawiązaniu do wykonanych testów symulacyjnych (ST) i testu Waples'a (WT) w odniesieniu do różnych wartości N_e Doktorant interpretuje wyniki pośrednie analiz poszukując właściwej odpowiedzi, na pytanie czy obserwowana zmienność jest efektem wyłącznie dryfu genetycznego czy też doboru naturalnego. Ostatecznie sugerowanym jest, że zmiany częstości wariantu *CCR5Δ32* między populacją historyczną a współczesną mogą wynikać z dryfu genetycznego, zaś w przypadku *CCR2-64I* i *SDF 1-3'A* raczej wynikiem doboru negatywnego.

W dyskusji Doktorant ponownie udowadnia swoje przygotowanie merytoryczne, umiejętnie prowadząc czytelnika przez tematy związane z funkcjonowaniem układu immunologicznego, w kontekście analiz genetycznych populacji historycznych z uwzględnieniem mechanizmów ewolucyjnych. Bazując na dostępnych w literaturze informacjach, iż badane lokalne społeczności nie były duże, Autor wyjaśnia iż oceniana zmienność genu *CCR5* jest efektem działania dryfu. Następnie przedstawianą tezę szeroko dyskutuje w odniesieniu do danych literaturowych, które w zależności od kontekstu sugerują odmienne mechanizmy ewolucyjne, wpływające na obserwowaną częstość wariantów. Brak spójności w cytowanych wynikach prac badawczych Autor interpretuje jako wspierające swoją tezę, wskazując na dostępne prace, które również opierają się na procesach stochastycznych w odniesieniu do częstości występowania *CCR5Δ32* w badanych populacjach historycznych.

Uwzględniając wyniki symulacji dla pozostałych dwóch wariantów oraz nieliczne dostępne dane literaturowe w tym kontekście Doktorant sugeruje, że obserwowana częstość wariantów

genów *CCR2* i *SDF* jest najprawdopodobniej efektem działania doboru negatywnego. Autor podkreśla oryginalność przeprowadzonych analiz, gdzie jednocześnie ocenia zmienność w trzech dobranych genach w analizach populacji historycznych. Umiejętnie prowadzona narracja prowadzi czytelnika do ostatecznej sugestii jakoby wirus brodawczaka ludzkiego (HPV) mógł być czynnikiem doboru, zwłaszcza w odniesieniu do *CCR2-64I* i *SDF 1-3'A*. Na koniec dyskusji Doktorant z ostrożnością podchodzi do prezentowanych wyników analiz symulacyjnych, wskazując, że kompozycja wybranych miejsc polimorficznych jest oryginalna, a dane literaturowe głównie odnoszą się do związku analizowanych wariantów z infekcją wirusem HIV. Ostatecznie Doktorant wskazuje, że uzyskane wyniki mogą być wstępem do badań zakrojonych na szerszą skalę, aby dalej zgłębiać intrygujący temat koewolucji między patogenami a układem immunologicznym człowieka na przestrzeni dziejów.

Przedstawione na koniec pracy wnioski klarownie podsumowują uzyskane wyniki i wysnute tezy.

Uwagi do pracy:


Praca napisana jest czytelnie i trudno w niej doszukać się błędów natury edycyjnej, które zaburzałyby odbiór przez czytelnika. Poniżej wymieniono zauważone usterki:

1. Doktorant stosuje w prezentacji danych liczbowych separator dziesiętny z użyciem znaku kropki, a nie przecinka.
2. W stosowanych skrótach i w wykazie skrótów, często przedstawiane jest jedynie polskie tłumaczenie, bez wyjaśnienia pochodzenia międzynarodowego skrótu, np. NGS, HTS, FIV.
3. Od opisy rysunku piątego w pracy wkradł się błąd w numeracji prezentowanych rycin, konsekwentnie do końca pracy.

4. W odniesieniu do populacji historycznych, analizowanych pod kątem genetycznym Doktorant używa określenia populacji kopalnych. Wydaje się, że ten termin stosowany jest raczej w dociekaniach paleontologicznych. Sugeruję używanie określenia np. populacje historyczne/antyczne.

Całość prezentowanej rozprawy wskazuje na ogrom wykonanej pracy laboratoryjnej oraz z zakresu analizy danych. Rozbudowane rozdziały wstępne i ciekawie prowadzona dyskusja wraz z ogromną liczbą cytowanych prac badawczych pokazują merytoryczne przygotowanie doktoranta do przyszłej samodzielnej pracy naukowej.

Wobec powyższego, w mojej ocenie, rozprawa doktorska magistra Łukasza Śledzińskiego spełnia warunki określone w art. 219 ustawy z 20. lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz.U. z 2021 r., poz.478) i tym samym zwracam się do Rady Naukowej Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie Pana mgra Łukasza Śledzińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK PRACOWNI
BIOBANK UŁ

dr Dominik Strapagiel, prof. UŁ