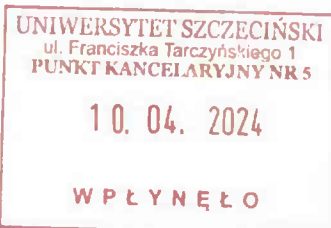




dr hab., prof. UAM Mirosława Dabert
Wydział Biologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6, 61-614 Poznań
Tel. 61 829 5738; E-mail: mirkad@amu.edu.pl



Recenzja
rozprawy doktorskiej Pani mgr Barbary Wąsowicz
pt. „Polimorfizm regionu kontrolnego mitochondrialnego DNA
mieszkańców województwa zachodniopomorskiego w kontekście
powojennej historii regionu”

Podstawą formalną recenzji jest pismo Przewodniczącej Rady Naukowej Instytutu Biologii Uniwersytetu Szczecińskiego z dnia 2 lutego 2024 r. Praca została wykonana w Katedrze Genetyki i Genomiki Instytutu Biologii na Uniwersytecie Szczecińskim. Promotorem rozprawy jest Pani dr hab. Marianna Soroka, prof. US.

Ocena formalna

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska jest monografią w formie manuskryptu o łącznie liczbie 148 stron, z czego główne rozdziały (Wstęp, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski) zajmują 113 stron, a pozostałe strony zawierają spis materiałów źródłowych (Literatura) i informacje dodatkowe na temat pochodzenia materiału badawczego (Aneks 1) i haplogrup mitochondrialnego DNA (mtDNA) zidentyfikowanych u mieszkańców województwa zachodniopomorskiego (Aneks 2). Ponadto monografia zawiera streszczenia w j. polskim i angielskim oraz wykaz słów kluczowych. Jest to standardowy układ treści dla prac eksperymentalnych. Podział treści między rozdziałami jest prawidłowy. Na przeprowadzenie badania Doktorantka uzyskała zgodę Komisji Bioetycznej przy Okręgowej Izbie Lekarskiej w Szczecinie (nr 14/KB/VI/2017).

Praca jest starannie wyedytowana, poza kilkoma drobnymi błędami: wprowadzone skróty powinny być dalej konsekwentnie stosowane, np. nić lekka (L) i ciężka (H), mtDNA; zapis liczb poniżej dziesięciu powinien być ujednolicony (słowa albo cyfry); mówimy o 100% identyczności zamiast „podobieństwa”, a adresy baz danych powinny znaleźć się w miejscu, gdzie po raz pierwszy dana baza jest wymieniana. Ogólnie, praca jest napisana poprawnym językiem naukowym, z jednym wyjątkiem, jakim jest sposób przedstawiania wyników częstości występowania haplogrup, przypominający raczej relację sportową („zajęła ostatnie miejsce”, „zajmuje dopiero 5 miejsce” itp.). Drobną uwagę dotyczy też tytułu rozdziału 2.3 Analiza sekwencyjna, który powinien brzmieć „Analiza sekwencji”. Metody są opisane dokładnie, czasami zbyt szczegółowo, ponieważ przytoczone informacje można znaleźć w dokumentacji zastosowanych programów oraz w podręcznikach. W natoku tych informacji Autorka pominęła opis metodyki zastosowanej

do analiz sieci haplotypów (Network). Mam też uwagę formalną dotyczącą wyników zaprezentowanych w Tabeli 7, która w mojej opinii tabelą nie jest, ponieważ poza pierwszą, pozostałe kolumny nie mają tytułów; lepszą formą zaprezentowania wyniku byłby wykres słupkowy z legendą dotyczącą kolorów zastosowanych dla poszczególnych haplogrup. Mam też uwagę dotyczącą określenia przyjętego dla zmian w mtDNA wyróżniających poszczególne haplogrupy. Ten rodzaj substytucji w mtDNA jest polimorfizmem (zwykle) pojedynczych nukleotydów (SNP), który utrzymuje się w populacji ze stosunkowo wysoką częstością. Określenie „mutacja” w tym przypadku jest błędne i powinno być zarezerwowane dla zmian, które występują w populacji z niską częstością ze względu na działanie doboru.

Ostatnia uwaga formalna dotyczy braku informacji na temat zdeponowania uzyskanych sekwencji w ogólnodostępnej bazie danych. Autorka podaje „zdeponowanie uzyskanych w niniejszej dysertacji sekwencji w bazie EMPOP” jako jeden z celów rozprawy doktorskiej, tymczasem w pracy nie ma informacji, czy te sekwencje zostały opublikowane.

Podsumowując, moja ogólna ocena formalna rozprawy doktorskiej Pani mgr Wąsowicz jest pozytywna, z zastrzeżeniem, że informacje dotyczące opublikowania sekwencji zostaną przedstawione w trakcie obrony rozprawy doktorskiej.

Ocena merytoryczna

Tematyka rozprawy doktorskiej Pani mgr Barbary Wąsowicz dotyczy zróżnicowania genetycznego ludności współcześnie zamieszkującej województwo zachodniopomorskie na podstawie analizy sekwencji mtDNA. Cele i założenia pracy są napisane dość skromnie, brakuje celów cząstkowych, których wyznaczenie ułatwiłoby zredagowanie pracy od metodyki, poprzez prezentację rezultatów, dyskusję i wnioski. Głównym celem pracy było oszacowanie poziomu zmienności mtDNA mieszkańców województwa zachodniopomorskiego, co miało pozwolić na wnioskowanie o wpływie powojennej migracji ludności na obserwowaną zmienność, a kolejnym zdeponowanie uzyskanych w niniejszej dysertacji sekwencji w bazie EDNAP Mitochondrial DNA Population Database (EMPOP; <https://empop.online/>), co miało zwiększyć poziom poznania polskiej, a tym samym europejskiej populacji. Baza EMPOP, mimo że nie aktualizowana od końca 2019 roku (dane ze strony <https://empop.online/updates>, dostęp 2.04.2024), nadal jest wykorzystywana w celach badawczych i sądowych, dlatego uznaję, że tak postawiony cel pracy również miał uzasadnienie naukowe.

Baza EMPOP gromadzi dane głównie z najbardziej zmiennego fragmentu mtDNA, tj. rejonu kontrolnego. Autorka oparła swoje badania o ten sam marker DNA, co pozwoliło jej wykorzystać opublikowane dane do analiz porównawczych. Badania zostały przeprowadzone na grupie 300 osób, starannie wyselekcjonowanych, aby uzyskać statystyczną reprezentację badanej populacji, w tym subpopulacje miejskie i wiejskie. To ostatnie ujawnia kolejny cel pracy, niewymieniony wcześniej przez Autorkę, a mianowicie zbadanie struktury populacji.

Doktorantka przeprowadziła analizy porównawcze dla danych sekwencyjnych z całego regionu kontrolnego, wykorzystując 16 populacji z 14 krajów; o ile wyodrębnienie populacji Żydów aszkenazyjskich z Węgier i rodzimych Węgrów jest uzasadnione, to niejasne jest rozdzielanie Niemców na populację z Monachium i z Ulm, skoro oba miasta znajdują się dość blisko siebie w południowej części kraju. Osobna analiza dotyczyła zmienności ograniczonej do rejonów hiperzmiennych HVSI i HVSII, obejmująca oprócz badanej zachodniopomorskiej, również sześć

populacji z Polski i dziesięć z zagranicy. Rozumiem sens wykonywania analizy dla całego regionu kontrolnego, ponieważ poza HVSI i HVSII również występują miejsca polimorficzne. Zastanawiam się jednak, dlaczego w przypadku analizy dotyczącej wyłącznie HVSI i HVSII Doktorantka nie skorzystała z całego zbioru danych, ograniczając dane sekwencyjne 16 populacji europejskich do rejonów HVSI i HVSII. Umożliwiłoby to rozszerzenie danych porównawczych o reprezentację populacji z zachodu i południa Europy.

Ogółem, Autorka uzyskała pełne sekwencje rejonu kontrolnego (ok. 1100 pz) dla wszystkich wytypowanych do badania osób, z czego dla 270 osób były to kontigi złożone z sekwencji obu nici DNA. W badanej populacji zidentyfikowała 206 miejsc polimorficznych, w tym 193 tranzycje, 23 transwersje i 10 polimorfizmów typu insercja/delecja. Wyniki te wskazują, że uzyskane przez Autorkę dane są wiarygodne i mogły być podstawą do przeprowadzenia analiz statystycznych. W przebadanej grupie, bazując na danych z całego regionu kontrolnego, Autorka zidentyfikowała 20 makrohaplogrup mtDNA, w tym wykryła 51 dodatkowych miejsc polimorficznych poza HVSI i HVSII. Zmienność mtDNA u osób w województwie zachodniopomorskim odpowiadała zmienności znajdowanej w intensywnie próbkowanych populacjach zamieszkujących całe kraje (np. Holandię, Rumunię), co potwierdziło hipotezę Autorki o wpływie przesiedleń po II wojnie światowej na zwiększenie różnorodności genetycznej populacji współcześnie zamieszkującej badane tereny. Porównanie subpopulacji miejskiej i wiejskiej nie wykazało różnic, co jest oczekiwanym wynikiem biorąc pod uwagę krótki czas obejmujący tylko dwa-trzy pokolenia i intensywną migrację do miast, która miała miejsce w tym rejonie w latach 60. i 70. XX wieku. Dodatkowym wynikiem badań, raczej niedostrzeżonym przez Autorkę, jest nowa subhaplogrupa J, którą ujawniła analiza sieci haplotypów na ryc. 11; wprawdzie jej haplotypy są zaznaczone tym samym kolorem co J1c, ale są wyraźnie oddzielone od pozostałych przez haplotypy J1b. Część rezultatów Doktorantka poświęca obliczeniom współczynnika w celu wykazania wpływu liczby przebadanych prób na liczbę wykrytych haplogrup. Mnie ta metoda nie przekonuje; zamiast tego należało sprawdzić, czy dane mają rozkład normalny i przeprowadzić test niezależności chi kwadrat, ale pozostawiam to do dyskusji w trakcie obrony.

Swoje wyniki Doktorantka dyskutuje głównie z najbardziej reprezentatywnym badaniem mtDNA populacji Polski, które było oparte na innej metodzie identyfikacji haplogrup. Dlatego chciałabym w trakcie obrony zapytać Autorkę, jak metodyka zastosowana w publikacji p. dr Jarczak et al. (2019) mogła wpłynąć na rozbieżność wyników dotyczących częstości występowania haplogrup w populacji zachodniopomorskiej (np. ryc. 21, tab. 31). Przy okazji wspomnę, że autorzy publikacji nadal aktywnie działają w nauce, więc Doktorantka mogła podjąć próbę wyjaśnienia podnoszonych w dyskusji wątpliwości dotyczących próbkowania. Dalsza część dyskusji jest poświęcona bazie danych EMPOP. Autorka zauważa, że baza od dość dawna nie jest aktualizowana i doszukuje się przyczyn jej „zastoju” m.in. w ściśle sprecyzowanych wymaganiach dotyczących pozyskiwania i analizowania haplotypów w oparciu o rejony HVSI i HVSII. W mojej opinii, wynika to raczej z wzrastającej dostępności taniego i wydajnego sekwencjonowania kompletnych genomów mitochondrialnych, które wnoszą znacząco więcej informacji niż same rejony hiperzmienne. Przede wszystkim, kompletne genomy umożliwiają określić faktyczny haplotyp mtDNA. Dane z rejonu kontrolnego w rzeczywistości pozwalają oznaczyć podgrupę (subklad), na potrzeby niniejszej rozprawy nazywaną haplotypem, ale rozumianym jako wariant sekwencji określonego fragmentu mtDNA. Tymczasem, poza tym fragmentem też występują polimorfizmy, które ostatecznie składają się na haplotyp mtDNA. Jeszcze trudniej jest mi się zgodzić z argumentami Doktorantki na temat potencjału i ograniczeń badań mtDNA w genetyce populacyjnej człowieka (rozd. 4.6). Stwierdzenie, że większość publicznie dostępnych danych

dotyczących kompletnych genomów mitochondrialnych i identyfikacji nowych haplogrup pochodzi ze źródeł komercyjnych nie jest poparte żadnym źródłem. Tymczasem we wstępie wymienia bazy GenBank i MITOMAP (<https://www.mitomap.org/MITOMAP>), gdzie jest dostępnych ponad 60 tys. kompletnych genomów mitochondrialnych. Chyba, że Autorka miała na myśli nie sekwencje, ale narzędzia do analizy danych całogenomowych, jak to opracowane dla firmy Qiagen przez Shen-Gunther et al. (2023).

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest monografią, której wyniki do tej pory nie były publikowane. Naturalnym jest, że w takich przypadkach uwag krytycznych jest dużo więcej niż w pracach, które już przeszły przez ocenę kilku recenzentów i edytorów czasopism. Zaczynając od tych najważniejszych: w analizie danych brakuje właściwych metod statystycznych do wyznaczenia współczynników różnorodności w populacjach (alfa) i pomiędzy populacjami (beta), co dałoby wgląd w faktyczną ich różnorodność (liczbę różnych typów danych w zbiorze danych). Również ograniczenie analiz porównawczych do pięciu najczęstszych haplogrup powinno być lepiej uzasadnione, ponieważ mogło wpłynąć na rozdzielczość uzyskanych wyników. Wstęp należałoby ograniczyć do omawiania wyłącznie mtDNA człowieka, ponieważ pewne stwierdzenia dotyczące ogólnie zwierząt czy wszystkich królestw, są nieściste: np. typowy zakres długości mtDNA u zwierząt wnosi 15-20 tys. pz (Boore 1999), a sekwencjonowanie genomów ujawniło, że są od niego znaczące wyjątki, co więcej mtDNA nie zawsze jest dziedziczony wyłącznie matczynie, zwłaszcza dotyczy to roślin. Omówienie dotyczące struktury populacji pradziejowych powinno być uzupełnione o nowsze prace, szczególnie dotyczące terenów Polski. W badaniu kryminalistycznym ślad mtDNA może być zastosowany w celu wykluczenia bądź zawężenia grupy, ale nie jest dowodem rozstrzygającym (potwierdzenie). Trudno też się zgodzić ze stwierdzeniem, że niektóre z polimorfizmów regionu kontrolnego mtDNA mogą wpływać na długowieczność czy predyspozycje do chorób. Owszem, wykazano, że pewne haplogrupy, np. T, J, K, mogą być powiązane z niektórymi procesami chorobowymi, ale ze względu na to, że niosą ze sobą pewne warianty aminokwasowe (Ruiz-Pesini et al. 2004). Podobnie, to nie polimorfizmy regionu kontrolnego mają wartość funkcjonalną, tylko mutacje somatyczne w tym rejonie, na które działa dobór (Samuels et al. 2013). Mam też wątpliwość dotyczącą interpretacji danych ze spisów powszechnych: zadeklarowanie narodowości niemieckiej czy ukraińskiej i używanego języka w spisie z 2021 roku niekoniecznie wynika z ciągłości procesów po II wojnie światowej, bo równie dobrze może dotyczyć nowych zdarzeń migracyjnych. Przy okazji drobna uwaga: przesiedlenie ludności niemieckiej z ich wschodnich terytoriów nie było decyzją władz hitlerowskich, tylko niemieckich, bo tereny te były ówczesnie administrowane przez państwo niemieckie. Szkoda, że w tabeli 2 nie uwzględniono >170 kompletnych genomów mitochondrialnych uzyskanych z danych kopalnych (aDNA) dla populacji pradziejowych, z których część zamieszkiwała współczesne tereny Polski. Niektóre zdania powinny być inaczej sformułowane, np. "pośród wszystkich 17 populacji polskich i europejskich, obejmujących 4028 próbki/osoby zidentyfikowano 1987 haplotypów (49,3%)" - czego dotyczy wartość 49,3%? Domyślam się, że 49,3% zgenotypowanych osób miało unikalny haplotyp mtDNA, ale ze zdania wprost to nie wynika. Ryciny 22-24 przedstawiają zależności pomiędzy liczebnością reprezentacji/próbkowania populacji a badanymi parametrami (liczba zidentyfikowanych haplotypów/ miejsc polimorficznych/ wartość zróżnicowania haplotypowego). Nie widzę uzasadnienia, żeby znajdowały się w Dyskusji, zamiast w Wynikach; inna sprawa, że w trakcie przygotowywania publikacji radziłabym zrezygnować z tych rezultatów, bo niewiele wnoszą do wiedzy, zwłaszcza, że nie są wsparte statystycznie. Zakładam, że wyniki pracy zostaną opublikowane, ponieważ są wartościowe i zasługują na to, dlatego część z tych uwag Doktorantka może uwzględnić przygotowując manuskrypty.

Wniosek końcowy

Powyższe uwagi są wstępem do dyskusji podczas obrony i nie wpływają na moją ogólną pozytywną ocenę przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej. Podjęta tematyka ma wartość naukową, a Doktorantka wykazała się umiejętnością planowania i realizacji badań naukowych i dyskusowania uzyskanych wyników.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U.2017 poz. 1789 ze zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Uniwersytetu Szczecińskiego o dopuszczenie Pani mgr Barbary Wąsowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Poznań, 4 kwietnia 2024 r.





dr hab., prof. UAM Mirosława Dabert
Wydział Biologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6, 61-614 Poznań
Tel. 61 829 5738; E-mail: mirkad@amu.edu.pl

Recenzja
rozprawy doktorskiej Pani mgr Barbary Wąsowicz
pt. „Polimorfizm regionu kontrolnego mitochondrialnego DNA
mieszkańców województwa zachodniopomorskiego w kontekście
powojennej historii regionu”

Podstawą formalną recenzji jest pismo Przewodniczącej Rady Naukowej Instytutu Biologii Uniwersytetu Szczecińskiego z dnia 2 lutego 2024 r. Praca została wykonana w Katedrze Genetyki i Genomiki Instytutu Biologii na Uniwersytecie Szczecińskim. Promotorem rozprawy jest Pani dr hab. Marianna Soroka, prof. US.

Ocena formalna

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska jest monografią w formie manuskryptu o łącznie liczbie 148 stron, z czego główne rozdziały (Wstęp, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski) zajmują 113 stron, a pozostałe strony zawierają spis materiałów źródłowych (Literatura) i informacje dodatkowe na temat pochodzenia materiału badawczego (Aneks 1) i haplogrup mitochondrialnego DNA (mtDNA) zidentyfikowanych u mieszkańców województwa zachodniopomorskiego (Aneks 2). Ponadto monografia zawiera streszczenia w j. polskim i angielskim oraz wykaz słów kluczowych. Jest to standardowy układ treści dla prac eksperymentalnych. Podział treści między rozdziałami jest prawidłowy. Na przeprowadzenie badania Doktorantka uzyskała zgodę Komisji Bioetycznej przy Okręgowej Izbie Lekarskiej w Szczecinie (nr 14/KB/VI/2017).

Praca jest starannie wyedytowana, poza kilkoma drobnymi błędami: wprowadzone skróty powinny być dalej konsekwentnie stosowane, np. nić lekka (L) i ciężka (H), mtDNA; zapis liczb poniżej dziesięciu powinien być ujednolicony (słowa albo cyfry); mówimy o 100% identyczności zamiast „podobieństwa”, a adresy baz danych powinny znaleźć się w miejscu, gdzie po raz pierwszy dana baza jest wymieniana. Ogólnie, praca jest napisana poprawnym językiem naukowym, z jednym wyjątkiem, jakim jest sposób przedstawiania wyników częstości występowania haplogrup, przypominający raczej relację sportową („zajęła ostatnie miejsce”, „zajmuje dopiero 5 miejsce” itp.). Drobna uwaga dotyczy też tytułu rozdziału 2.3 Analiza sekwencyjna, który powinien brzmieć „Analiza sekwencji”. Metody są opisane dokładnie, czasami zbyt szczegółowo, ponieważ przytoczone informacje można znaleźć w dokumentacji zastosowanych programów oraz w podręcznikach. W natłoku tych informacji Autorka pominęła opis metodyki zastosowanej

do analiz sieci haplotypów (Network). Mam też uwagę formalną dotyczącą wyników zaprezentowanych w Tabeli 7, która w mojej opinii tabelą nie jest, ponieważ poza pierwszą, pozostałe kolumny nie mają tytułów; lepszą formą zaprezentowania wyniku byłby wykres słupkowy z legendą dotyczącą kolorów zastosowanych dla poszczególnych haplogrup. Mam też uwagę dotyczącą określenia przyjętego dla zmian w mtDNA wyróżniających poszczególne haplogrupy. Ten rodzaj substytucji w mtDNA jest polimorfizmem (zwykle) pojedynczych nukleotydów (SNP), który utrzymuje się w populacji ze stosunkowo wysoką częstością. Określenie „mutacja” w tym przypadku jest błędne i powinno być zarezerwowane dla zmian, które występują w populacji z niską częstością ze względu na działanie doboru.

Ostatnia uwaga formalna dotyczy braku informacji na temat zdeponowania uzyskanych sekwencji w ogólnodostępnej bazie danych. Autorka podaje „zdeponowanie uzyskanych w niniejszej dysertacji sekwencji w bazie EMPOP” jako jeden z celów rozprawy doktorskiej, tymczasem w pracy nie ma informacji, czy te sekwencje zostały opublikowane.

Podsumowując, moja ogólna ocena formalna rozprawy doktorskiej Pani mgr Wąsowicz jest pozytywna, z zastrzeżeniem, że informacje dotyczące opublikowania sekwencji zostaną przedstawione w trakcie obrony rozprawy doktorskiej.

Ocena merytoryczna

Tematyka rozprawy doktorskiej Pani mgr Barbary Wąsowicz dotyczy zróżnicowania genetycznego ludności współcześnie zamieszkującej województwo zachodniopomorskie na podstawie analizy sekwencji mtDNA. Cele i założenia pracy są napisane dość skromnie, brakuje celów cząstkowych, których wyznaczenie ułatwiłoby zredagowanie pracy od metodyki, poprzez prezentację rezultatów, dyskusję i wnioski. Głównym celem pracy było oszacowanie poziomu zmienności mtDNA mieszkańców województwa zachodniopomorskiego, co miało pozwolić na wnioskowanie o wpływie powojennej migracji ludności na obserwowaną zmienność, a kolejnym zdeponowanie uzyskanych w niniejszej dysertacji sekwencji w bazie EDNAP Mitochondrial DNA Population Database (EMPOP; <https://empop.online/>), co miało zwiększyć poziom poznania polskiej, a tym samym europejskiej populacji. Baza EMPOP, mimo że nie aktualizowana od końca 2019 roku (dane ze strony <https://empop.online/updates>, dostęp 2.04.2024), nadal jest wykorzystywana w celach badawczych i sądowych, dlatego uznaję, że tak postawiony cel pracy również miał uzasadnienie naukowe.

Baza EMPOP gromadzi dane głównie z najbardziej zmiennego fragmentu mtDNA, tj. rejonu kontrolnego. Autorka oparła swoje badania o ten sam marker DNA, co pozwoliło Jej wykorzystać opublikowane dane do analiz porównawczych. Badania zostały przeprowadzone na grupie 300 osób, starannie wyselekcjonowanych, aby uzyskać statystyczną reprezentację badanej populacji, w tym subpopulacje miejskie i wiejskie. To ostatnie ujawnia kolejny cel pracy, niewymieniony wcześniej przez Autorkę, a mianowicie zbadanie struktury populacji.

Doktorantka przeprowadziła analizy porównawcze dla danych sekwencyjnych z całego regionu kontrolnego, wykorzystując 16 populacji z 14 krajów; o ile wyodrębnienie populacji Żydów aszkenazyjskich z Węgrów i rodzimych Węgrów jest uzasadnione, to niejasne jest rozdzielenie Niemców na populację z Monachium i z Ulm, skoro oba miasta znajdują się dość blisko siebie w południowej części kraju. Osobna analiza dotyczyła zmienności ograniczonej do rejonów hiperzmiennych HVSI i HVSII, obejmująca oprócz badanej zachodniopomorskiej, również sześć

populacji z Polski i dziesięć z zagranicy. Rozumiem sens wykonywania analizy dla całego regionu kontrolnego, ponieważ poza HVSI i HVSII również występują miejsca polimorficzne. Zastanawiam się jednak, dlaczego w przypadku analizy dotyczącej wyłącznie HVSI i HVSII Doktorantka nie skorzystała z całego zbioru danych, ograniczając dane sekwencyjne 16 populacji europejskich do rejonów HVSI i HVSII. Umożliwiłoby to rozszerzenie danych porównawczych o reprezentację populacji z zachodu i południa Europy.

Ogółem, Autorka uzyskała pełne sekwencje rejonu kontrolnego (ok. 1100 pz) dla wszystkich wytypowanych do badania osób, z czego dla 270 osób były to kontigi złożone z sekwencji obu nici DNA. W badanej populacji zidentyfikowała 206 miejsc polimorficznych, w tym 193 transzycje, 23 transwersje i 10 polimorfizmów typu insercja/delecja. Wyniki te wskazują, że uzyskane przez Autorkę dane są wiarygodne i mogły być podstawą do przeprowadzenia analiz statystycznych. W przebadanej grupie, bazując na danych z całego regionu kontrolnego, Autorka zidentyfikowała 20 makrohaplogrup mtDNA, w tym wykryła 51 dodatkowych miejsc polimorficznych poza HVSI i HVSII. Zmienność mtDNA u osób w województwie zachodniopomorskim odpowiadała zmienności znajdowanej w intensywnie próbkowanych populacjach zamieszkujących całe kraje (np. Holandię, Rumunię), co potwierdziło hipotezę Autorki o wpływie przesiedleń po II wojnie światowej na zwiększenie różnorodności genetycznej populacji współcześnie zamieszkującej badane tereny. Porównanie subpopulacji miejskiej i wiejskiej nie wykazało różnic, co jest oczekiwanym wynikiem biorąc pod uwagę krótki czas obejmujący tylko dwa-trzy pokolenia i intensywną migrację do miast, która miała miejsce w tym rejonie w latach 60. i 70. XX wieku. Dodatkowym wynikiem badań, raczej niedostrzeżonym przez Autorkę, jest nowa subhaplogrupa J, którą ujawniła analiza sieci haplotypów na ryc. 11; wprowadź jej haplotypy są zaznaczone tym samym kolorem co J1c, ale są wyraźnie oddzielone od pozostałych przez haplotypy J1b. Część rezultatów Doktorantka poświęca obliczeniom współczynnika w celu wykazania wpływu liczby przebadanych prób na liczbę wykrytych haplogrup. Mnie ta metoda nie przekonuje; zamiast tego należało sprawdzić, czy dane mają rozkład normalny i przeprowadzić test niezależności chi kwadrat, ale pozostawiam to do dyskusji w trakcie obrony.

Swoje wyniki Doktorantka dyskutuje głównie z najbardziej reprezentatywnym badaniem mtDNA populacji Polski, które było oparte na innej metodzie identyfikacji haplogrup. Dlatego chciałabym w trakcie obrony zapytać Autorkę, jak metodyka zastosowana w publikacji p. dr Jarczak et al. (2019) mogła wpłynąć na rozbieżność wyników dotyczących częstości występowania haplogrup w populacji zachodniopomorskiej (np. ryc. 21, tab. 31). Przy okazji wspomnę, że autorzy publikacji nadal aktywnie działają w nauce, więc Doktorantka mogła podjąć próbę wyjaśnienia podnoszonych w dyskusji wątpliwości dotyczących próbkowania. Dalsza część dyskusji jest poświęcona bazie danych EMPOP. Autorka zauważa, że baza od dość dawna nie jest aktualizowana i doszukuje się przyczyn jej „zastoju” m.in. w ściśle sprecyzowanych wymaganiach dotyczących pozyskiwania i analizowania haplotypów w oparciu o rejon HVSI i HVSII. W mojej opinii, wynika to raczej z wzrastającej dostępności taniego i wydajnego sekwencjonowania kompletnych genomów mitochondrialnych, które wnoszą znacząco więcej informacji niż same rejon hiperzmiennie. Przede wszystkim, kompletne genomy umożliwiają określić faktyczny haplotyp mtDNA. Dane z rejonu kontrolnego w rzeczywistości pozwalają oznaczyć podgrupę (subklad), na potrzeby niniejszej rozprawy nazywaną haplotypem, ale rozumianym jako wariant sekwencji określonego fragmentu mtDNA. Tymczasem, poza tym fragmentem też występują polimorfizmy, które ostatecznie składają się na haplotyp mtDNA. Jeszcze trudniej jest mi się zgodzić z argumentami Doktorantki na temat potencjału i ograniczeń badań mtDNA w genetyce populacyjnej człowieka (rozd. 4.6). Stwierdzenie, że większość publicznie dostępnych danych

dotyczących kompletnych genomów mitochondrialnych i identyfikacji nowych haplogrup pochodzi ze źródeł komercyjnych nie jest poparte żadnym źródłem. Tymczasem we wstępie wymienia bazy GenBank i MITOMAP (<https://www.mitomap.org/MITOMAP>), gdzie jest dostępnych ponad 60 tys. kompletnych genomów mitochondrialnych. Chyba, że Autorka miała na myśli nie sekwencje, ale narzędzia do analizy danych całogenomowych, jak to opracowane dla firmy Qiagen przez Shen-Gunther et al. (2023).

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest monografią, której wyniki do tej pory nie były publikowane. Naturalnym jest, że w takich przypadkach uwag krytycznych jest dużo więcej niż w pracach, które już przeszły przez ocenę kilku recenzentów i edytorów czasopism. Zaczynając od tych najważniejszych: w analizie danych brakuje właściwych metod statystycznych do wyznaczenia współczynników różnorodności w populacjach (alfa) i pomiędzy populacjami (beta), co dałoby wgląd w faktyczną ich różnorodność (liczbę różnych typów danych w zbiorze danych). Również ograniczenie analiz porównawczych do pięciu najczęstszych haplogrup powinno być lepiej uzasadnione, ponieważ mogło wpłynąć na rozdzielczość uzyskanych wyników. Wstęp należałoby ograniczyć do omawiania wyłącznie mtDNA człowieka, ponieważ pewne stwierdzenia dotyczące ogólnie zwierząt czy wszystkich królestw, są nieściśle: np. typowy zakres długości mtDNA u zwierząt wnosi 15-20 tys. pz (Boore 1999), a sekwencjonowanie genomów ujawniło, że są od niego znaczące wyjątki, co więcej mtDNA nie zawsze jest dziedziczony wyłącznie matczynie, zwłaszcza dotyczy to roślin. Omówienie dotyczące struktury populacji pradziejowych powinno być uzupełnione o nowsze prace, szczególnie dotyczące terenów Polski. W badaniu kryminalistycznym ślad mtDNA może być zastosowany w celu wykluczenia bądź zawężenia grupy, ale nie jest dowodem rozstrzygającym (potwierdzenie). Trudno też się zgodzić ze stwierdzeniem, że niektóre z polimorfizmów regionu kontrolnego mtDNA mogą wpływać na długowieczność czy predyspozycje do chorób. Owszem, wykazano, że pewne haplogrupy, np. T, J, K, mogą być powiązane z niektórymi procesami chorobowymi, ale ze względu na to, że niosą ze sobą pewne warianty aminokwasowe (Ruiz-Pesini et al. 2004). Podobnie, to nie polimorfizmy regionu kontrolnego mają wartość funkcjonalną, tylko mutacje somatyczne w tym rejonie, na które działa dobór (Samuels et al. 2013). Mam też wątpliwość dotyczącą interpretacji danych ze spisów powszechnych: zadeklarowanie narodowości niemieckiej czy ukraińskiej i używanego języka w spisie z 2021 roku niekoniecznie wynika z ciągłości procesów po II wojnie światowej, bo równie dobrze może dotyczyć nowych zdarzeń migracyjnych. Przy okazji drobna uwaga: przesiedlenie ludności niemieckiej z ich wschodnich terytoriów nie było decyzją władz hitlerowskich, tylko niemieckich, bo tereny te były ówczesnie administrowane przez państwo niemieckie. Szkoda, że w tabeli 2 nie uwzględniono >170 kompletnych genomów mitochondrialnych uzyskanych z danych kopalnych (aDNA) dla populacji pradziejowych, z których część zamieszkiwała współczesne tereny Polski. Niektóre zdania powinny być inaczej sformułowane, np. "pośród wszystkich 17 populacji polskich i europejskich, obejmujących 4028 próbki/osoby zidentyfikowano 1987 haplotypów (49,3%)" - czego dotyczy wartość 49,3%? Domyślam się, że 49,3% zgenotypowanych osób miało unikalny haplotyp mtDNA, ale ze zdania wprost to nie wynika. Ryciny 22-24 przedstawiają zależności pomiędzy liczebnością reprezentacji/próbkowania populacji a badanymi parametrami (liczba zidentyfikowanych haplotypów/ miejsc polimorficznych/ wartość zróżnicowania haplotypowego). Nie widzę uzasadnienia, żeby znajdowały się w Dyskusji, zamiast w Wynikach; inna sprawa, że w trakcie przygotowywania publikacji radziłabym zrezygnować z tych rezultatów, bo niewiele wnoszą do wiedzy, zwłaszcza, że nie są wsparte statystycznie. Zakładam, że wyniki pracy zostaną opublikowane, ponieważ są wartościowe i zasługują na to, dlatego część z tych uwag Doktorantka może uwzględnić przygotowując manuskrypty.

Wniosek końcowy

Powyższe uwagi są wstępem do dyskusji podczas obrony i nie wpływają na moją ogólną pozytywną ocenę przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej. Podjęta tematyka ma wartość naukową, a Doktorantka wykazała się umiejętnością planowania i realizacji badań naukowych i dyskusowania uzyskanych wyników.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U.2017 poz. 1789 ze zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Uniwersytetu Szczecińskiego o dopuszczenie Pani mgr Barbary Wąsowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Poznań, 4 kwietnia 2024 r.