



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM

PAN - Instytut Immunologii
Wpł. dnia 14.09.2022.....
L.dz.

Prof. dr hab. n. med. Beata Kieć-Wilk

Kierownik Pracowni Rzadkich Chorób Metabolicznych
Katedra Chorób Metabolicznych UJ CM
ul. M. Jakubowskiego 2
budynek I poziom +1
30-688 Kraków
tel. (012) 400 38 72
e-mail: beata.kiec-wilk@uj.edu.pl

Kraków, dnia 11.09.2022

Ocena
dysertacji mgr inż. Agaty Witkowicz
pt: „ Wybrane polimorfizmy genu *UCP1*, badanie ich znaczenia funkcjonalnego i związku z ryzykiem wystąpienia otyłości i z zespołu metabolicznego”
na stopień doktora Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN
we Wrocławiu.

Częstość występowania zespołu metabolicznego (MetS) jest wysoka, dotyczy 15-34% populacji europejskiej i stale rośnie. Wieloletnie badania i obserwacje wytypowały elementy składowe tego złożonego zaburzenia metabolicznego, jednak do tej pory mechanizm postawiania zaburzeń, nie został do końca poznany.

Przedstawiana do oceny rozprawa poświęcona jest analizie jednego z uznanych patomechanizmów rozwoju METS, zmienionej homeostazie energetycznej organizmu, w tym funkcji termogeniny 1 (UCP1). Wtórna do otyłości brzusznej zaburzona homeostaza lipidowo-węglowodanowa, insulinooporność współwystępująca z przewlekłym stanem zapalnym i nadprodukcją ROS; wynikają z zburzonej funkcji łańcucha oddechowego w mitochondriach i produkcji ATP.

W założeniu pracy Doktorantka skupiła swoją uwagę na polimorfizmach genu UCP1, zarówno znanych i opisanych, jak i poszukiwała nowych zmian nukleotydowych w genie, jako czynnika ryzyka wystąpienia otyłości i zespołu metabolicznego.

Praca powstała w ramach realizacji międzynarodowego projektu IRSES w ramach UE FW7 p.t. ”Mulinational Network of excellence for research on genetic predisposition to cardio-metabolic disorders due to UCP-1 gene polymorphisms”. Praca pochodzi Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu.

Przedstawiona do oceny dysertacja składa się z przewidzianych regulaminem dla tego typu opracowań akapitów, 27 rycin, 19 tabel i 174 pozycji piśmiennictwa.



Wstęp stanowi wzorcowo opracowane wprowadzenie do tematu badawczego przygotowane w oparciu o szeroko ujęte piśmiennictwo, epidemiologię, badania podstawowe jak i wielośrodkowe obserwacje kliniczne. We wstępie przytoczono opracowania biochemiczne i molekularne dotyczące poznanych i sugerowanych teorii rozwoju w tym insulinooporności w otyłości i jej powikłań w postaci zespołu metabolicznego. Omówiona jest rola i udział „przewlekłego odczynu immunologiczno-zapalnego” indukowanego przez tkankę tłuszczową w procesach patologicznych. Przeanalizowano rodzaje tkanki tłuszczowej jak i jej rolę w organizmie człowieka. Skupiono uwagę na procesie termogenezy w tym funkcji transmembranowego białka termogeniny 1, będącego przedmiotem rozprawy.

Osobny rozdział wstępu poświęcony jest tematyce znanych polimorfizmów genu *UCP-1* oraz ich roli w rozwoju zaburzeń metabolicznych i otyłości.

Cele pracy. Precyzyjnie opracowany wstęp wiedzie do sformułowania celów pracy przedstawionych jasno i zawierających skrót zadań badawczych podjętej pracy. Głównym celem badania było zbadanie związku znanych polimorfizmów genu *UCP-1* z ryzykiem wystąpienia otyłości i zespołu metabolicznego jak również badanie funkcjonalnego znaczenia tych SNP.

Realizacja projektu oparta była na wytypowaniu, w oparciu o dane literaturowe, znanych polimorfizmów genu *UCP-1* i analiza ich związku z wystąpieniem otyłości i MetS. Poszukiwaniu nowych, nieopisanych wariantów *UCP-1* przy zastosowaniu NGS. Jako analizę funkcjonalną badano ekspresję genu *UCP-1* w mononuklearach krwi obwodowej pacjentów i uczestników grupy kontrolnej oraz wykonano transfekcje wektorowych w liniach komórkowych HepG2 i PAZ6.

Metody przedstawione są w sposób bardzo szczegółowy i rzetelny, co charakteryzuje tą dysertację i świadczy o praktycznej znajomości używanego warsztatu doświadczalnego przy zastosowaniu bardzo szerokiego i nowoczesnego spektrum metod biologii molekularnej, hodowli komórkowych i mikroskopii. Autorka rozprawy charakteryzuje się z umiejętnością zebrania i podsumowania badań teoretycznych i klinicznych.

W rozprawie widoczna jest istotna dysproporcja opisu zastosowanej metodyki biologii molekularnej w stosunku do charakterystyki i opisu zasad kwalifikacji uczestników badania.

Grupę badaną stanowiło 281 pacjentów z zespołem metabolicznym (w tym 29 osób miało dodatkowo rozpoczętą i leczoną DMt2) (Pacjenci Kliniki Chorób Wewnętrznych UM w Poznaniu). Do



badania kwalifikowano pacjentów spełniających kryteria zespołu metabolicznego wg wytycznych IDF-AHA/NHLBI z 2009 roku. Wykonano badania antropometryczne, rutynowe badania biochemiczne.

Grupę kontrolną stanowiło 365 zdrowych osób – z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa we Wrocławiu, u których wykonano pomiary antropometryczne i analizę zawartości tkanki tłuszczowej, czego nie wykonano u chorych z MetS.

W metodyce pracy zwraca szczególnie bardzo duża staranność i szczegółowy opis zastosowanych metod biologii molekularnej. W bardzo systematyczny i uporządkowany sposób przedstawia zastosowane odczynniki, sekwencja primerów, sond, mapy wektorów, jak również użyte w hodowlach komórkowych media hodowlane. Autorka przeprowadza nas niemal krok po kroku przez każdy etap badań. Podaje dokładny protokół, warunki reakcji, skład mieszanin reakcyjnych od izolacji DNA czy RNA, oznaczania SNP metodą RFLP, poprzez sekwencje sond w metodzie Real-Time PCR, przygotowanie bibliotek w NGS samo sekwencjonowanie w MiSeq Illumina, analizę biostatystyczną.

Analiza ekspresji genów *UCP-1* i *UCP-2*, w komórkach krwi obwodowej pacjentów wraz ze szczegółowym opisem protokołu real-time PCR ekspresyjnego. Aż do analiz funkcjonalnych i transfekcji wektorowej linii komórkowych w celu analizy aktywności promotorowej badanych polimorfizmów. Sam opis zastosowanych technik jest opatrzony 2 rycinami i 6 tabelami, które w sposób obrazowy i przejrzysty przybliżają przedstawiane techniki i warunki reakcji.

Wyniki. Doktorantka w sposób systematyczny i dojrzały, krytycznie przedstawia opracowanie wyników badań. W opisie wyników, podobnie jak w metodyce dominuje bardzo szczegółowy opis danych z zakresu biologii molekularnej.

W charakterystyce grup badanych zwraca uwagę duża dysproporcja liczebności grup MetS 252, MetS+DMt2 29 osób, kontrola 365 osób. W charakterystyce parametrów klinicznych i biochemicznych grup nie wykonano analizy statystycznej, a niektóre parametry istotnie różniły się pomiędzy grupami MetS vs DMt2. Zawraca również uwagę fakt, że grupa kontrolna nie była scharakteryzowana biochemicznie przez to porównanie/charakterystyka i dobór grup badanych budzi zdecydowany niedosyt i może być istotnym, zaburzającym czynnikiem analiz. Jest to szczególnie ważne gdyż analiza dystrybucji genotypów SNPs genu *UCP1* w badanych grupach nie była w pełni zgodna z danymi literaturowymi.

Doktorantka skupiła się na badaniu polimorfizmów których częstość allelu rzadkiego $> 0,3\%$. Badano cztery wytypowane SNPs: A-3826G; A-112C ; Ala64Thr (c.G1068A); Met229Leu (wg NHI, PubMed substytucja T>A). Istotną różnicę zaobserwowano dla zmutowanego allelu G polimorfizmu A-3826G, który występował częściej u osób zdrowych z grupy kontrolnej. Analiza haplotypów potwierdziła rolę allelu G polimorfizmu A-3826G oraz allelu T Met229Leu jako związanych z około 30% zmniejszeniem ryzyka zachorowania na MetS.



Dalsze analizy NGS w poszukiwaniu nowych polimorfizmów *UCP1* objęły cały region kodujący wraz z obszarem 5' UTR i 3'. Dotyczyły 36 osób zdrowych 30 osób z MetS i 29 pacjentów z DMt2- w dysertacji nie ma niestety podanych danych klinicznych i biochemicznych porównujących/charakteryzujących te grupy badane. Jest natomiast bardzo szczegółowy opis przeprowadzonych analiz z użyciem dwóch niezależnych bibliotek części kodującej i regionów 3' i 5' *UCP1*. Początkowo analiza bioinformatyczna zidentyfikowała 85 pozycji w obrębie genu *UCP1*. Po zastosowaniu jasno i precyzyjnie określonych kryteriów włączenia do analizy ostatecznie wytypowano 25 wariantów potencjalnie związanych z ryzykiem rozwoju DMt2 oraz 14 polimorfizmów związanych z wystąpieniem MetS. Cztery warianty zidentyfikowano jako potencjalnie związane z MetS i DMt2.

Analiza ekspresji genu *UCP1* i *UCP2* w mononuklearach krwi obwodowej badanych osób. Wytypowano 20 osób z DMt1, 19 osób otyłych i 22 osoby z grupy kontrolnej. Ponownie nie popadano charakterystyki analizowanych grup. W przypadku *UCP1* wykazano brak ekspresji tego genu u osób zdrowych i z DMt2 ale potwierdzono słabą ekspresję u 3 osób (15,7%) osób w grupie otyłych uczestników. Analiza ekspresji *UCP2* w grupie osób z zaburzeniami metabolicznymi (otyłość i grupa z DMt2) charakteryzowała się niższym poziomem ekspresji genu niż grupa kontrolna.

Ocena funkcjonalnego znaczenia badanych polimorfizmów charakteryzuje się bardzo dokładnym i rzetelnym przeprowadzeniem eksperymentów ale także dbaniem o szczegóły. Przeprowadzono nie tylko analizę białka *UCP1* w trakcie różnicowania linii komórkowej PAZ6 w kierunku BAT, analizowano zmiany ekspresji genów markerowych jak i dolność gromadzenia lipidów przez komórki. Wykorzystywano metody molekularnej biologii, klasyczne barwienie OilRed jak i barwienia immunofluorescencyjne w mikroskopii konfokalnej.

Analiza aktywności promotorowej genu *UCP1* była przeprowadzona odzienie dla linii HepG2 oraz PAZ6. Eksperymenty przeprowadzono trzykrotnie w tryplikatach co warunkuje uzyskanie wiarygodnej i wystarczającej ilości próbek do dalszych analiz statystycznych.

Polimorfizm A-112C nie miał istotnego wpływu na poziom *UCP1* w porównaniu z grupą kontrolną. Najwyższą aktywność promotorowa obserwowano, natomiast po stymulacji norepinefryną linii A112C/3826A.

Podsumowując wyniki przedstawione zostały w sposób bardzo szczegółowy jednakże równocześnie bardzo przystępny, dzięki zastosowaniu przez Doktorantkę licznych rycin w ilości 16, 11 tabel, oraz 9 wykresów.

Dyskusja stanowi bardzo staranne, omówienie wyników na tle innych badań dostępnych w odniesieniu do aktualnego piśmiennictwa z dziedziny biologii molekularnej. W omawianiu wyników uwzględniono również najnowszą sytuację epidemiologiczną, autorka podkreśla znaczenie MetS jako czynnika ryzyka negatywnie wpływającego na przeżywalność chorych. Doktorantka przytoczyła najnowsze obserwacje dotyczące wpływu występowania MetS i cięższego przebiegu infekcji SARS-COV-2, u tych pacjentów.



Dobrze dobrane pozycje literaturowe potwierdzają celowość przeprowadzenia omawianego badania, wraz z kolejnymi jego etapami. Doktorantka omawiając poszczególne etapy badań i uzyskane wyniki, sama zwraca uwagę na pewne niedociągnięcia metodyczne badania jak np. istotnie młodsza grupa kontrolna w porównaniu z podgrupa z MetS.

Wnioski - stanowią podsumowanie wyników badań i dyskusji; postawione są w sposób wyważony i z rozmysłem.

Warto zaznaczyć że uzyskane wyniki zostały przedawnione w 3 publikacjach, dwie w ramach czasopisma *Postępy Hig Med. doświadczalnej Online* oraz jednej artykuł w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym *PlosOne* w 2022, o współczynniku oddziaływania IF 3,24. A także w formie 6 prezentacji plakatowych jak i doniesień ustnych na konferencjach krajowych jak i międzynarodowych m.in. EWIC2017, FESB czy EFI.

Przy recenzji powyższej, rzetelnie poprowadzonej dysertacji, nasunęły się recenzentowi nieliczne uwagi i komentarze, które można rozważyć czy uwzględnić przy przygotowaniu kolejnego opracowania do druku. Jako laboratoryjny genetyk kliniczny doceniam i podziwiam zakres badań z zakresu biologii molekularnej. Jednak jako wieloletni, aktywny zawodowo, klinicysta zwróciłam uwagę na kilka dodatkowych aspektów pracy.

- Oczywiście słabym punktem pracy wspomiana już dysproporcja analizowanych grup, brak charakterystyki klinicznej uczestników badania jak i porównania oraz nieoptymalne dobranie analizowanych podgrup.

- Nasuwa się pytanie czy w grupie chorych z „czystym” MetS wykluczono istnienie DMt2. Otyłość i wiek chorych (średnio 60 lat) są czynnikami istotnie zwiększającymi ryzyko występowania DMt2, która często przebiega w sposób subkliniczny. Nie znaleziono informacji czy u chorych wykonano OGTT z 75 g glukozy lub czy oznaczano u uczestników HbA1c. Brak wykluczenie DMt2 w podgrupie MetS podważa nieco przedstawiony podział kliniczny badanych populacji.

- Nie podano również danych co do modelu leczenia DMt2 i stopnia wyrównania metabolicznego u tych chorych. Już sama średnia stężenia glukozy na czczo (151,8±/± 56,14 mg%) sugeruje nieoptymalne wyrównanie choroby. DMt2 o dużej zmienności glikemii jest niezależnym



czynnikiem stymulującym procesy zapalny i produkcję ROS co może być potencjalnym czynnikiem zakłócającym analizy.

Z drobnych uwag zwraca uwagę:

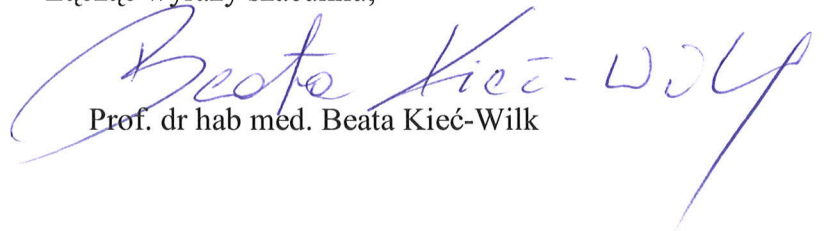
- nie do końca przekonujące uzasadnienie obecności allelu G w polimorfizmie -3826 A/G genu *UCPI* w związku ze zmniejszonym ryzykiem wystąpienia zespołu metabolicznego w populacji polskiej, co jest w sprzeczności z poprzednimi obserwacjami.

- Badanie funkcjonalne polimorfizmów (transfekcja wektorowa) odniosło się do analizy ilości białka w komórkach bez analizy samej funkcji produktu białkowego, co mogło być potencjalnym wytłumaczeniem i wzmocnieniem argumentów pracy. Może natomiast być punktem wyjścia do dalszych, ciekawych badań

Powyższe uwagi poczynione pod wpływem bardzo sumiennego opracowania opisu badań i wyników i z obowiązku, stanowią refleksje recenzenta po przeczytaniu dojrzałe przygotowanej rozprawy. Rozprawa świadczy o nowoczesnym i sumiennym podejściu Doktorantki, do warsztatu badań naukowych, bardzo dużej wiedzy i umiejętności wykorzystania najnowszych metod biologii molekularnej. Na szczególne docenienie zasługuje zastosowanie przez zespół badawczy tak szerokiej gamy badań z zakresu biologii molekularnej i tak bogaty warsztat i zaplecze techniczne.

Na tej podstawie zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu o nadanie biegu dalszym etapom przewodowi doktorskiego mgr inż. Agaty Witkowicz.

Łącząc wyrazy szacunku,


Prof. dr hab med. Beata Kieć-Wilk