

prof. dr hab. Iwona Szatkowska
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny
W Szczecinie
Katedra Nauk o Zwierzętach Przeżuwających
Pracownia Biologii Molekularnej
ul. Klemensa Janickiego 29
Szczecin

Szczecin, 26.10.2024r.

Rada Naukowa Instytut Zootechniki PIB 35-083 Baboń, ul. Krawowska 1 Sekretariat WPEŁYNIŁO 6.11.2024 v	
Znak sprawy	-
Podpis	Zal

Recenzja

rozprawy doktorskiej pt. „Wykorzystanie techniki mikromacierzy CGH w poszukiwaniu mikrorearanżacji genomu konia”, wykonanej w Instytucie Zootechniki (PIB) przez mgr inż. Katarzynę Kowalską pod kierunkiem prof. dr hab. Moniki Bugno-Poniewierskiej

Oświadczam, że wykonanie bezstronnej recenzji niniejszej pracy jest w granicach moich możliwości, nie istnieją żadne przesłanki uniemożliwiające jej wykonanie oraz nie zachodzą inne okoliczności, skutkujące niemożnością jej wykonania.

Przedłożona do oceny praca doktorska w formie monografii zawiera osiem rozdziałów (przeгляд literatury, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie, wnioski, literatura) oraz streszczenia w języku polskim i angielskim, a więc jest typowym układem dysertacji doktorskich, nie budzących żadnych zastrzeżeń. Tytuł pracy sformułowany minimalistycznie, bowiem obok techniki aCGH, ważnym narzędzie metodycznym była technika FISH, której w tytule zabrakło.

Odpowiednio wysoki poziom cech rozrodczych zwierząt, obok oczywiście ukierunkowanej selekcji, stanowi podstawę efektywności hodowli zarówno w sferze ilościowej, jak i jakościowej (zysk selekcyjny). Są to truizmy, ale warte podkreślenia. W tym kontekście zmiany cytogenetyczne, zwłaszcza te niezbalansowane genetycznie, mogą ograniczać nie tylko funkcje życiowe na różnych etapach rozwoju, ale też prowadzić do pierwotnej bezpłodności. W układzie mozaikowym przynoszą one mniej dotkliwe skutki reprodukcyjne, wywołując zazwyczaj obniżenie płodności, spowodowane albo niewielkimi dysfunkcjami życiowymi, albo faktem ulokowania zmian chromosomowych w komórkach linii germinalnej, co po koniugacji i rekombinacji, a następnie segregacji mejozy sprzyja powstawaniu, obok prawidłowych, gamet niezbalansowanych genetycznie, z których utworzone zarodki mają niewielkie szanse na przeżycie już w pierwszych etapach embriogenezy. Jak akcentuje Doktorantka, badania cytogenetyczne zwierząt przyczyniły się do identyfikacji wielu nieprawidłowości chromosomowych, szeroko prezentując przede wszystkim aberracje cytogenetyczne diagnozowane w oparciu o klasyczne metody (hodowla limfocytów T, standardowe i prążkowe techniki barwienia chromosomów, ocena

mikroskopowa). Wśród nich wyróżnić można aneuploidie z najczęściej występującą u klaczy monosomię X oraz trisomiami odnoszącymi się do chromosomów płci i autosomów, translokacje wzajemne, fuzje centryczne, izochromosomy X, a także zjawisko rewersji płci. Nie wszystkie jednak nieprawidłowości można korelować z aberracjami chromosomowymi. Zabrakło krótkiego opisu genów zaangażowanych w proces determinacji i różnicowania płci – procesów, których nieprawidłowy przebieg prowadzi do zaburzeń rozwojowych układu rozrodczego z rewersją płci łącznie. Opisano już wiele molekularnych determinantów autosomalnych i allosomalnych, odpowiedzialnych za męskie i żeńskie ścieżki rozwojowe. Opisano także geny autosomalne i sprzężone z płcią, o których Doktorantka nie wspomniała, skorelowane z zaburzeniami płodności. Nie zawsze czynniki pierwszej grupy korelują z drugimi.

Ogólnie jednak przedstawiony „rys historyczny”, czyli klasyka metod cytogenetycznych jest nadal aktualny, bowiem występowanie aberracji chromosomowych jest faktem – kwestią zasadniczą jest natomiast szacowanie częstości ich występowania (~ 2 – 5%). Czy warto zatem sięgnąć po bardziej czułe metody diagnostyczne? Doktorantka zdecydowanie po nie sięgnęła.

Jedną z nich jest fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*, umożliwiającą szybką analizę płytek metafazowych nawet o gorszej jakości i różnej kondensacji chromosomów z wykorzystaniem specyficznych dla poszczególnych chromosomów sond malujących. Bardzo przydatne narzędzie, ułatwiające diagnostykę zrównoważonych i niezrównoważonych cytogenetycznie aberracji chromosomowych.

Bardziej czułą techniką, bo wykrywającą nawet najmniejsze, niebalansowane rearanżacje chromosomowe, trudne do identyfikacji technikami konwencjonalnymi, jest porównawcza hybrydyzacja genomowa (CGH) do oligonukleotydowych macierzy DNA, wykrywająca ~10-20% aberracji. Co istotne, pozwala ona na ocenę wszystkich chromosomów w jednym eksperymencie, a identyfikacja submikroskopowych delecji i duplikacji tą techniką daje wyjątkowo wysoką rozdzielczość. Metoda ta, umożliwiającą uzyskanie „molekularnego kariotypu”, ma jednak pewne ograniczenia, wynikające z braku możliwości wykrywania rearanżacji genetycznie zrównoważonych.

Rozwijając kontekst submikroskopowych delecji lub duplikacji, Doktorantka podjęła w części teoretycznej (przeгляд piśmiennictwa) kwestię zjawiska CNV (Copy Number Variation), czyli występowania zmiennej liczby kopii genomowego DNA. W mojej opinii, zbyt skromnie odniosła się do potencjalnych zmian, jakie może nieść za sobą zmiana liczby kopii. Pomijając bowiem mechanizmy ich powstawania, warto zaznaczyć, że nie tylko duplikacje/delecje regionów kodujących, ale także pozagenowych, mogą nieść ze sobą różne skutki, przekładające się na funkcjonowanie organizmów. Poza potencjalną zmianą dawki zdefiniowanych w duplikonach genów, warto podkreślić, że genomy ssaków, w tym koni, stanowią zwartą i nieprzypadkową strukturę, w której sekwencje kodujące stanowią margines szacowany na 2 – 5%. Pozostała część genomowego DNA (~90%) ulega transkrypcji, ale nie

translacji. Wśród tych makrocząsteczek opisano niekodujące obszary DNA o długości setek nukleotydów, zwane regionami ultrakonserwatywnymi (UCR – ultra-conserved regions), skupione wokół genów odpowiadających za wczesne etapy organogenezy. Funkcje intronów w regulacji alternatywnego składania, enhancery, obszary promotorowe, pseudogeny wzmacniające lub osłabiające ekspresję genów, sekwencje LINE i SINE, a nawet endogenne retowirusy, pełnią znaczące role w regulacji ekspresji genów. Pozostały odsetek genomowego DNA, nie ulegający transkrypcji, stanowi specyficzne sekwencje umożliwiające tworzenie domen w skondensowanych chromosomach metafazowych, kompleksów synaptonemalnych, łączących się specyficznym DNA oraz alfoid, czyli centromerowy DNA, umożliwiające montaż kinetochorów w czasie podziału komórek.

Co zatem może wynikać z duplikacji/delecji takich regionów i jaka jest ich potencjalna funkcja? Na to pytanie Doktorantka postanowiła odpowiedzieć tworząc koncepcję badawczą, nie obawiając się zalewu danych, w oparciu o które wyciąganie jednoznacznych wniosków może być problematyczne. Odważne i interesujące.

Podsumowując można powiedzieć, bez względu na sformułowane wcześniej uwagi raczej natury dyskusyjnej, że Pani mgr Katarzyna Kowalska skonfrontowała ze sobą dwa stulecia – XX wiek zdominowany przez klasyczne techniki cytogenetyczne i wiek XXI – z technikami molekularnymi tak zaawansowanymi, że ich interpretacja wymaga stosowania skomplikowanych narzędzi bioinformatycznych.

Cel pracy został sformułowany w sposób czytelny i obejmuje pogłębioną analizę zmian chromosomowych u koni obu płci obarczonych zaburzeniami układu rozrodczego i zaburzeniami płodności, identyfikację niezrównoważonych mikrorearanżacji możliwych do wykrycia techniką porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy (aCGH) oraz weryfikację techniki aCGH jako narzędzia do oceny nieprawidłowości kariotypu konia, a także potencjalne wykorzystanie uzyskanych wyników jako dodatkowego kryterium selekcyjnego zwierząt hodowlanych. Na etapie formułowania celów badawczych bardzo ambitnie.

Materiałem do badań były dwie grupy koni: pierwszą stanowiły klacze z wadami rozwojowymi lub bezpłodne (11 osobników), ale bez zmian cytogenetycznych w klasycznej diagnostyce, natomiast drugą osobniki interseksualne, z wadami rozwojowymi układu rozrodczego lub prawidłowo rozwinięte, ale ze zdiagnozowanymi nieprawidłowościami kariotypu w formie mozaikowej (11 osobników). Imponująca kolekcja. Warto jednak zaznaczyć, że formy mozaikowe powinny być analizowane nie tylko w oparciu o tkankę krwionośną, ale także o inny, w miarę dostępny materiał biologiczny, jak fibroblasty skóry właściwej, czy komórki pobrane z cebulek włosowych. Jest to ważne o tyle, że różne linie komórkowe ułożone jedynie w tkance krwionośnej niewiele mają wspólnego z nieprawidłowościami rozwojowymi układu rozrodczego, a analiza dodatkowego materiału biologicznego uprawdopodobniłaby taki wpływ.

Metody badawcze - hodowla limfocytów T, fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* z wykorzystaniem sond molekularnych specyficznych dla chromosomów płci, identyfikacja aberracji z wykorzystaniem mikromacierzy CGH oraz walidacja wyników uzyskanych z mikromacierzy metodą PCR z pomiarem produktu w czasie rzeczywistym, zostały dobrane w sposób prawidłowy, a ich zalety i kontrowersje przedstawiłam we wcześniejszych akapitach.

Należy podkreślić, że koncepcja i metodyka podjętych przez Doktorantkę badań jest trudna, wymagająca znacznego doświadczenia, dostępu do sond molekularnych i specjalistycznej aparatury. Oparciem na pewno była Pani prof. dr. hab. Monice Bugno-Poniewierskiej, promotor pracy, wybitna specjalistka w zakresie analiz cytogenetycznych i molekularnych koni, jedyna albo jedna z niewielu w Polsce, a na pewno jedna z niewielu na świecie.

Wyniki badań Doktorantka zaprezentowała w formie indywidualnego opisu poszczególnych przypadków. W pierwszej grupie doświadczalnej, do której zakwalifikowano klacze z prawidłowo bądź nieprawidłowo ukształtowanym układem rozrodczym, wszystkie osobniki miały prawidłowy kariotyp oraz częściową duplikację chromosomu X w różnym stopniu. Z kolei w drugiej grupie, do sformowania której przyjęto kryterium wcześniej opisanych zmian kariotypowych w formie mozaikowej, znalazły się osobniki interseksualne oraz klacze z różnym nasileniem zmian w budowie układu rozrodczego. Analiza aCGH wskazała występowanie duplikacji X w różnym stopniu oraz delecję X. Informacje o udziale poszczególnych linii komórkowych w tkance krwionośnej nie wnoszą nic. Prawdopodobieństwo, że inne rodzaje tkanek mają podobny rozkład linii komórkowych, bez zbadania problemu, jest niewielkie.

Najbardziej interesującą część tego rozdziału stanowią wyniki szczegółowej analizy genów, zlokalizowanych w zduplikowanych/delecyjnych regionach chromosomów 1, 7, 20 oraz X, mogących mieć potencjalny wpływ na procesy reprodukcyjne, rozwój narządów rozrodczych i determinację płci.

Walidacja uzyskanych wyników metodą aCGH z wykorzystaniem techniki PCR z pomiarem produktu w czasie rzeczywistym potwierdziła zgodność na poziomie 68%.

W dyskusji Doktorantka wskazuje różnice w liczbie wszystkich amplifikacji i delecji, porównując wyniki własne w formie stosunku liczby amplifikacji do delecji z wynikami innych autorów. Stawia tezę, że takie porównania są trudne z uwagi na stosowanie różnych metod detekcji CVN, różnorodność międzypopulacyjną, międzypopulacyjną. Wydaje się kluczowy także dobór osobników do grup doświadczalnych oraz referencja. Zbyt wiele zmiennych, co czyni takie porównania niewiele wnoszącymi.

Geny z regionów objętych rearanżacjami podzielono na grupy chromosomowe, próbując przypisać im determinację konkretnych cech, funkcyjnie związanych z rozwojem układu rozrodczego i rozrodem, co dla wielu gatunków ssaków, w tym oczywiście koni, jest dobrze udokumentowane.

W podsumowaniu Doktorantka w sposób dojrzały i wyważony wskazuje na wiele problemów związanych z hodowlą i reprodukcją, a także na powolny postęp badań z zakresu genomiki koni,

mogących przyspieszyć poznanie genetycznego podłoża zaburzeń rozrodczych. Co jednak najważniejsze, zdaje sobie sprawę, że nowe dane uzyskane w niniejszych badaniach odnośnie zmiennej liczby kopii DNA w genomie konia stanowią zbyt duże wyzwanie z powodu ograniczonej wiedzy na temat specyficznych korelacji genów z różnymi cechami zwierząt, aby myśleć o ich użytecznym charakterze. Bardzo dobra część rozprawy doktorskiej!

W przedostatnim rozdziale – wnioski – zmieniałbym jego tytuł na stwierdzenia i wnioski, bowiem są to w większości stwierdzenia (pierwsze 6 punktów), wnioski nie wynikające z przeprowadzonych badań (punkt przedostatni) oraz bezdyskusyjne wnioski zawarte tylko w 3 punktach, z którymi należy się zgodzić, mianowicie: metoda aCGH nie może być stosowana jako jedyna w analizie cytomolekularnej koni, należy ją uzupełnić o metodę FISH; analiza aCGH dostarcza imponującej liczby danych, stanowiąc zbyt duże wyzwanie, aby można ją stosować w praktyce; istnieje potrzeba dalszych badań z tego zakresu.

Piśmiennictwo dobrane prawidłowo.

Podsumowanie

Obszar percepcyjny, pozwalający zinterpretować uzyskane w przedłożonej do recenzji pracy wyniki, jest olbrzymi. Wybór metod badawczych należy uznać za jak najbardziej zasadny, ale przy założeniu, że to dopiero początkowy etap badań, zważywszy złożoność genomu konia oraz korelacje między poszczególnymi jego obszarami tak w kontekście fizycznym, jak i ekspresyjnym.

Warto byłoby także w przyszłości rozważyć kryteria doboru zwierząt do poszczególnych grup doświadczalnych. Podział zwierząt na te z problemami rozrodczymi i te z nieprawidłowościami rozwojowymi układu rozrodczego – dwie kwestie, często różnie determinowane – mogłyby zniwelować tę swoistą pętlę interpretacyjną, wyłaniając więcej punktów stykowych dla tak stworzonych grup.

Proces determinacji płci ustala się już w momencie zapłodnienia obecnością poszczególnych allosomów i definiowany jest jako płć chromosomowa. W kolejnym etapie kiedy ustala się płć genetyczna i gonadalna, z bipotencjalnej gonady rozwijają się jajniki lub jądra (SRY i SOX9, męskie determinanty), w skrajnych przypadkach *ovotestis*. Po wykształceniu gonad rozpoczyna się proces różnicowania płci, przebiegający pod wpływem dobrze już zdefiniowanych genów i ich produktów białkowych, ostatecznie prowadząc do wykształcenia dróg wyprowadzających gamety i płci fenotypowej. Tuż przed porodem determinowana jest płć podwzgórza. Natomiast płodność koni, jak sama zauważa Doktorantka, to skomplikowane zjawisko, na które wpływ mają zarówno czynniki środowiskowe, jak i genetyczne. Wiele zaburzeń reprodukcji uważa się za poligenowe, a przyczyny wielu z nich nie są jeszcze poznane. Dlatego tworzenie jednej grupy doświadczalnej takich osobników uważam za dyskusyjne.

Próba interpretacji uzyskanych przez Doktorantkę wyników implikuje do zadawania wielu trudnych pytań: w jaki sposób geny zlokalizowane w obszarach duplikacyjnych/delecyjnych w poszczególnych regionach chromosomowych mogą wpływać na fenotyp; co ze zduplikowanymi/delecyjnymi genami z loci w chromosomach X, podlegających losowej lionizacji; czy konkretne cechy wynikające z CVN można jednoznacznie tłumaczyć ekspresyjnym efektem dawki genu, co w procesie determinacji i różnicowania płci odgrywa wyjątkowo znaczącą rolę. Mam nadzieję, że Doktorantka podejmie próbę odpowiedzi na nie w czasie publicznej obrony.

Biorąc pod uwagę wszystkie elementy opracowanej recenzji uważam, że mgr inż. Katarzyna Kowalska spełnia wszelkie warunki ubiegania się o stopień doktor, pomimo podniesionych kwestii o naturze raczej dyskusyjnej, w żadnym stopniu nie wpływających na merytoryczną stronę pracy, którą oceniam bardzo wysoko. Rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Uznaję zatem, iż spełnia warunki, określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 poz. 1789 ze zm.) w związku z art. 179 ust. 2 oraz ust. 3 pkt 2b Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. – Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie Wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 z późn. zm.). Wnoszę zatem wniosek do Rady Naukowej Instytutu Zootechniki – Państwowego Instytutu Badawczego o podjęcie dalszych czynności w sprawie nadania mgr inż. Katarzynie Kowalskiej stopnia doktora w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo.

