

Prof. dr hab. Izabela Szczerbal
Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pani mgr Katarzyny Kowalskiej

pt. **„Wykorzystanie techniki mikromacierzy CGH w poszukiwaniu mikrorearanżacji genomu koni”**

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA PRACY

Praca doktorska została wykonana w Instytucie Zootechniki - Państwowym Instytucie Badawczym (PIB) w Balicach pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Moniki Bugno-Poniewierskiej. Rozprawa doktorska została przygotowana jako klasyczne opracowanie monograficzne, obejmujące następujące rozdziały: *Streszczenie* w języku polskim i angielskim (po 1 stronie), *Przegląd literatury* (19 stron), *Cel pracy* (1 strona), *Materiały i metody* (17 stron), *Wyniki* (44 strony), *Dyskusja* (30 stron), *Podsumowanie* (2 strony), *Wnioski* (1 strona) oraz *Literatura* obejmujący imponującą liczbę pozycji literaturowych wynoszącą ponad 300. Cała praca liczy 142 strony i jest bogata w liczne tabele, schematy oraz mikrofotografie dokumentujące wyniki analizy cytogenetycznej. Badania do pracy sfinansowano w ramach projektu „Kierunki wykorzystania oraz ochrona zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich w warunkach zrównoważonego rozwoju” współfinansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, w ramach programu "Środowisko naturalne, rolnictwo i leśnictwo" - BIOSTRATEG, nr umowy: BIOSTRATEG2/297267/14/NCBR/2016.

Tematyka pracy doktorskiej dotyczy możliwości wykorzystania nowoczesnych metod badania genomu koni, na przykładzie zastosowania mikromacierzy CGH (aCGH – ang. *Array Comparative Genomic Hybridization*) do identyfikacji nierównoważonych zmian genomowych u zwierząt z zaburzeniami rozrodczymi lub rozwojowymi. Technika ta ma nieocenione znaczenie w diagnostyce chorób człowieka jednak jej stosowanie w diagnostyce genetycznej zwierząt ciągle jest ograniczone. Mając na uwadze ogromną rolę jaką odgrywają badania genetyczne w diagnozowaniu problemów z płodnością i rozrodem koni oraz w mniejszej skali identyfikację podłoża molekularnego wad rozwojowych, wprowadzenie nowych technik badawczych do rutynowej diagnostyki genetycznej koni jest niezwykle pożądane a podjęta tematyka pracy doktorskiej bardzo ważna nie tylko z punktu widzenia badań podstawowych ale możliwości ich aplikacji w medycynie weterynaryjnej i programach hodowli koni. Warto zaznaczyć, że Instytut Zootechniki w Balicach jest rozpoznawalnym w skali światowej

ośrodkiem, w którym od kilkudziesięciu lat prowadzone są badania cytogenetyczne i molekularne koni, a osiągnięcia naukowe promotora pracy doktorskiej - prof. dr hab. Moniki Bugno-Poniewierskiej wraz z zespołem wniosły istotny wkład w poznanie podłoża cytogenetycznego zaburzeń rozwoju płci koni, w tym w zakresie opisu wielu nowych nieprawidłowości chromosomowych u tego gatunku oraz doprowadziły do istotnego rozwoju metod diagnostyki cytogenetycznej koni, w oparciu o samodzielne tworzenie sond molekularnych wykorzystywanych w technice FISH. Wprowadzenie nowej techniki badawczej – aCGH jest zatem kolejnym krokiem milowym w rozwoju diagnostyki genetycznej koni. Należy docenić, że polski zespół badawczy z dużymi tradycjami w badaniach cytogenetycznych koni realizuje ambitne projekty badawcze, których celem jest wprowadzenie nowych metod cytogenomicznych w badaniach diagnostycznych tego gatunku.

OCENA MERYTORYCZNA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Rozprawę doktorską rozpoczynają streszczenia, w języku polskim i angielskim, które w mojej ocenie są zbyt skrótowo przedstawione, gdyż powinny zawierać wszystkie kluczowe elementy pracy doktorskiej, tj. wprowadzenie, cel pracy, metody, najważniejsze wyniki i wnioski. Doktorantka aż dwa akapity poświęciła na ogólne informacje a w niewielkim stopniu odniosła się do uzyskanych wyników i płynących z nich wniosków. W kolejnym rozdziale „Przegląd literatury” dokonano opisu rozwoju cytogenetyki, ze szczególnym uwzględnieniem metod badawczych, odniesiono się do badań cytogenetycznych koni, opisano rodzaje mutacji genomowych i chromosomowych, scharakteryzowano polimorfizmy typu CNV, czyli zmienność liczby kopii DNA oraz opisano kariotyp konia. Przedstawione treści są poprawne i dobrze wprowadzają czytającego do tematyki pracy doktorskiej, chociaż kolejność przedstawianych podrozdziałów mogłaby być bardziej przemyślana, np. dobrze byłoby najpierw omówić kariotyp konia a później opisać mutacje jakie zdiagnozowano u tego gatunku. Wybranych fragmenty tego rozdziału prezentują bardzo prostą wiedzę podręcznikową (np. podrozdział u mutacjach) a w innych brakuje odwołania do literatury (np. podrozdział o rysie historycznym diagnostyki cytogenetycznej). W części dotyczącej opisu występowania mutacji u zwierząt powinna zawsze znaleźć się informacja o występowaniu lub braku danej mutacji u koni a w prezentowanej pracy nie jest jasne czy takich doniesień nie było czy je pominięto. Cennym elementem tej części pracy jest odniesienie się do wielu pozycji literaturowych, w tym do prac publikowanych w ostatnich latach.

Rozdział napisany jest starannie a drobne błędy dotyczą jedynie m.in.:

- str. 7 - chyba powinno być ogiery o kariotypie 64,XX;
- str. 7 - w odniesieniu do aneuploidii XXY bardziej poprawne sformułowanie to zespół XXY a nie trisomia;
- str. 8 - w języku polskim używamy sformułowania zespół a nie syndrom;
- str. 8 - prawidłowy zapis kariotypu wymaga używania przecinka po diploidalnej liczbie chromosomów;
- str. 11 - w opisie prążków R metoda termicznej denaturacji nie jest jedyną stosowaną, gdyż powszechnie wykorzystywane jest także barwienie prążkami R oparte o wbudowanie BrdU;

- str. 12 – sformułowanie „aberracja odwrócenia płci” jest niepoprawne.

Cele pracy doktorskiej zostały poprawnie sformułowane i dotyczyły analizy zmian chromosomowych koni z zaburzeniami rozrodczymi lub rozwojowymi oraz weryfikacji użyteczności techniki porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy (aCGH) do badania nieprawidłowości chromosomowych koni. Postawione cele są ambitne i zawierają bardzo duży charakter poznaczy a dodatkowo aplikacyjny, ze względu na potrzebę opracowania nowych metod diagnostycznych koni z zaburzeniami rozrodczymi uwarunkowanymi genetycznie. W pracy brakuje sformułowania hipotez badawczych, które powinny znaleźć się w pracy o charakterze eksperymentalnym.

Rozdział „Materiały i Metody” został opisany bardzo szczegółowo. W badaniach wykorzystano materiał biologiczny od dwóch grup koni: grupę I stanowiło 11 osobników, u których stwierdzono wady rozwojowe, bezpłodność lub nieprawidłowości w rozwoju drugorzędowych cech płciowych ale metodami klasycznej cytogenetyki nie stwierdzono aberracji kariotypu, natomiast grupa II składała się z 11 osobników, u których zdiagnozowane różne nieprawidłowości kariotypu. W tabelach 1 i 2 zamiast słowa „ilość” powinno się znaleźć „liczba” a w przypadku zapisu kariotypu w niektórych opisach brakuje przecinka. W pracy zastosowano wiele metod badawczych, takich jak: prowadzenie hodowli limfocytów, technika fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH), analiza mikromacierzy CGH, ilościowy PCR. Opis metod badawczych jest bardzo precyzyjny, bogaty w liczne tabele przedstawiające warunki i składy poszczególnych reakcji. Takie podejście jest bardzo cenne w kontekście wykorzystania niniejszej pracy doktorskiej jako materiału źródłowego pozwalającego na powtórzenie czy kontynuowanie opisanych eksperymentów.

Po przeczytaniu tego rozdziału proszę o wyjaśnienie/doprecyzowanie następujących kwestii:

1. W technice FISH wykorzystywano sondy BAC-we specyficzne dla chromosomu X i sondę malującą specyficzną dla chromosomu Y. Dlaczego nie używano także sondy malującej dla chromosomu X i co decydowało o wyborze zestawu sond do analizy konkretnego osobnika, np. w przypadku klaczy XX - sondy specyficznej dla Y? Dla osobników z prawidłowym kariotypem stosowano różne podejścia – stosując jedną, dwie lub trzy sondy – czym było to podyktowane?
2. Dlaczego przyjęto dwa postępowania badawcze w przygotowaniu DNA referencyjnego w analizie mikromacierzy CGH? Raz analizowano 6 osobników względem DNA referencyjnego jednego ogiera a następnie pozostałe osobniki badano względem referencyjnego DNA będącego mieszaniną DNA ogierów.
3. W analizie CGH zwykle wykorzystuje się jako referencje DNA od XX lub będące mieszaniną DNA XX i XY. Dlaczego zdecydowano o wyborze referencyjnego DNA od ogiera/ogierów, szczególnie w kontekście badania głównie zwierząt z układem chromosomów płci XX i czy brano to pod uwagę przy interpretacji uzyskanych danych?

W rozdziale „Wyniki” kolejno opisywano uzyskane wyniki dla każdego z 22 analizowanych koni, przedstawiając najpierw wynik analizy FISH a następnie wyniki aCGH. Jakość mikrografii obrazujących wyniki FISH jest zróżnicowana, jednak sygnał hybrydyzacyjny jest na tyle widoczny, że można na jego podstawie dokonać diagnostyki - może poza mikrofotografią nr 6. Stosowanie tylko jedynej sondy dla chromosomu Y na płytkach

metafazowych 64,XX budzi pewne zastrzeżenia i winno być uzupełnione dodatkową sondą z chromosomu X (fot. 2). Na odnotowanie zasługuje objęcie analizą bardzo dużej liczby płytek metafazowych (zwykle ok. 400), co ma szczególne znaczenie w wykrywaniu więcej niż jednej linii komórkowej mogącej występować u badanego osobnika. Przedstawienie w formie tabeli udziału procentowego poszczególnych linii komórkowych u osobników z nieprawidłowym kariotypem bardzo ułatwia zapoznanie się danym wynikiem diagnostycznym. Wyniki aCGH zostały pokazane w formie tabelarycznej a w opisie przedstawiono geny, które uległy zmianie liczby kopii. W tabelach ponownie pojawia się słowo „ilość” zamiast liczba genów. Cennym elementem jest pokazanie w postaci graficznej rozkładu wykrytych zamian w liczbie kopii DNA w chromosomach. Nie znalazłam jednak w tekście odwołania do schematów 1 i 2 oraz 3-5. Walidację wyników CNV wykonano w oparciu o qPCR i pokazano w tabeli jako stopień zgodności w %. Czy mogę prosić o doprecyzowanie jak ten % był wyliczany? Analiza aCGH wykazała najwięcej przypadków zmian (amplifikacji) w chromosomie X – czy ta obserwacja może być wynikiem użycia kontrolnego DNA od osobników XY do badania genomu w większości osobników z kariotypem XX lub w przeważającej proporcji z tą linią dominująca (poza jednym przypadkiem gdzie przeważała linia monosomiczna)?

W podsumowaniu tej części pracy stwierdzam, że Doktorantka uzyskała bardzo dużo szczegółowych wyników, które z pewnością wymagały bardzo dużego nakładu pracy i zaangażowania. Wyniki zostały ciekawie zaprezentowane i omówione. Można było jedynie pokusić się o jakieś zbiorcze ich zestawienie na końcu rozdziału.

Za najważniejsze wyniki rozprawy doktorskiej uznaję:

1. Dokonanie kompleksowej analizy 22 przypadków koni z wadami układu rozrodczego lub rozwojowymi za pomocą kompleksowej analizy cytogenomicznej opartej o technikę FISH i aCGH.
2. Opracowanie i dostosowanie metodyki aCGH do diagnostyki genetycznej koni.
3. Wykazanie, że nowoczesne metody badania genomu na przykładzie aCGH nie pozwalają na wykrycie obecności drugiej linii komórkowej występującej w niskim udziale procentowym i ciągle istnieje potrzeba wykonywania badań diagnostycznych w oparciu o technikę FISH.
4. Opisanie zmian w liczbie kopii DNA (CNV) w genomach badanych koni i próba powiązania tych polimorfizmów z genami kandydującymi dla cech związanych z funkcjami rozrodczymi i płodnością.

W rozdziale „Dyskusja” Doktorantka umiejętnie konfrontuje uzyskane przez siebie wyniki z danymi literaturowymi. Rozdział jest obszerny i podzielony na podrozdziały dotyczące charakterystyki CNV w genomie konia i genów kodujących białka i miRNA znajdujących się w obrębie zidentyfikowanych CNV w badanych grupach koni oraz podjęcie metodycznych stosowanych w nowoczesnej diagnostyce genetycznej, tj. aCGH *versus* NGS. Rozdział zawiera krótkie podsumowanie, w którym Doktorantka dostrzega zalety i ograniczenia stosowania nowych metod cytogenomicznych w diagnostyce koni, co świadczy o jej dobrym przygotowaniu merytorycznym i dojrzałości naukowej. Rozprawę doktorską kończy rozdział „Wnioski”, w którym poza typowanymi wnioskami zwrócić też ogólne uwagi nazwane spostrzeżeniami. Ta część pracy stanowi kompleksowe podsumowanie uzyskanych wyników, wskazując na ograniczenia w stosowaniu nowoczesnych metod badania genomu, które generują dużo danych ale są ciągle trudne w interpretacji.

Podsumowując, stwierdzam, że założone cele pracy doktorskiej zostały w pełni zrealizowane za pomocą adekwatnych i nowoczesnych metod badawczych. Doktorantka wykazała się bardzo dobrym opanowaniem warsztatu badawczego, dobrze poradziła sobie z interpretacją bardzo wielu wyników i potrafiła je pokazać w szerszym kontekście naukowym, wskazując na ich znaczenie, ograniczenia i nakreślając dalsze kierunki badań. Przedstawiona do oceny praca doktorska stanowi istotny wkład w badania nad opracowaniem nowych podejść metodycznych w diagnostyce genetycznej koni.

WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pt. „*Wykorzystanie techniki mikromacierzy CGH w poszukiwaniu mikrorearanżacji genomu koni*” autorstwa mgr Katarzyny Kowalskiej spełnia wymogi formalne określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku: o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz 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 2018r. poz. 1669 z późn. zm.) stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę zatem do Rady Naukowej Instytutu Zootechniki PIB o przyjęcie przedstawionej rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr Katarzyny Kowalskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo.

Katarzyna Szerebel.

Poznań, dn. 18 listopada 2024r.