Prof. dr hab. Leyland Fraser
Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt
Wydział Bioinżynierii Zwierząt
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Prof. dr hab. Przemysław Sobiech
Katedra Chorób Wewnętrznych z Kliniką
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Olsztyn, dn. 21.11.2022 r.

Opinia PROMOTORÓW
dotycząca rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Katarzyny Mańkowskiej
pt. „Analiza polimorfizmu DNA oraz ekspresji wybranych genów związanych ze zróżnicowaną przydatnością plemników knura do kriokonserwacji''

W załączeniu przekazujemy rozprawę doktorską mgr inż. Anny Katarzyny Mańkowskiej wykonaną na podstawie cyklu artykułów opublikowanych w renomowanych czasopismach naukowych. Są to następujące prace:

1. **Mańkowska A.**, Brym P., Paukszto Ł., Jastrzębski J.P., Fraser L. (2020). Gene polymorphisms in boar spermatozoa and their associations with post-thaw quality. International Journal of Molecular Sciences 21 (5), 1902, *https://doi.org/10.3390/ijms21051902* (**IF = 5,924; 140 pkt.**).
2. **Mańkowska A.**, Brym P., Sobiech P., Fraser L. (2022). Promoter polymorphisms in *STK35* and *IFT27* genes and their associations with boar sperm freezability. Theriogenology 189, 199-208, *https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.06.023* (**IF = 2,923; 140 pkt.**).
3. **Mańkowska A.**, Gilun P., Zasiadczyk Ł., Sobiech P., Fraser L. (2022). Expression of *TXNRD1, HSPA4L* and *ATP1B1* genes associated with the freezability of boar sperm. International Journal of Molecular Sciences 23 (16), 9320, *https://doi.org/10.3390/ijms23169320* (**IF = 6,208; 140 pkt.**).

Przedłożona praca doktorska mgr inż. Anny Katarzyny Mańkowskiej to oryginalne dzieło, stanowiące próbę rozwiązania problemu doskonalenia technologii kriokonserwacji nasienia knura poprzez selekcję osobników produkujących ejakulaty charakteryzujące się dobrą przydatnością do kriokonserwacji. Praca obejmuje zagadnienia dotyczące identyfikacji markerów genetycznych warunkujących przydatność nasienia knura do kriokonserwacji. Do istotnych osiągnieć naukowych kandydatki zaliczyć należy publikacje, które w znacznym stopniu poszerzyły wiedzę na temat wyżej wymienionych markerów genetycznych. W dysertacji mgr inż. Anny Katarzyny Mańkowskiej można wyróżnić cztery główne aspekty: (**I**) identyfikacja markerów typu SNP, potencjalnie związanych z jakością nasienia po kriokonserwacji przy wykorzystaniu genotypowania metodą KASP, (**II**) identyfikacja

polimorficznych wariantów sekwencji DNA w promotorach genów wykazujących zróżnicowaną ekspresję w plemnikach knurów charakteryzujących się dobrą i słabą przydatnością do kriokonserwacji, (**III**) analiza ekspresji *TXNRD1, HSPA4L* i *ATP1B1* genów potencjalnie związanych ze zróżnicowaną jakością nasienia po kriokonserwacji, z wykorzystaniem techniki ilościowego PCR w czasie rzeczywistym (RT-qPCR), oraz (**IV**) potwierdzenie różnic w ekspresji białek plemnikowych podczas procedury kriokonserwacji nasienia przy wykorzystaniu różnych technik elektroforetycznych.

Konstrukcja pracy jest poprawna oraz odzwierciedla jej nowatorski charakter. Podstawę pracy stanowią trzy publikacje naukowe, które wraz z przedstawionym opracowaniem stanowią merytoryczną całość spełniającą wymogi rozprawy doktorskiej. Wśród najistotniejszych osiągnięć badawczych doktorantki uzyskanych w ramach pracy doktorskiej można wymienić: (**I**) potwierdzenie, że warianty alleliczne genów *APPL1, PLBD1, FBXO16, EML5, RAB3C, OXSR1, PRICKLE1* i *MAP3K20* są potencjalnymi markerami jakości nasienia po zamrożeniu-rozmrożeniu, (**II**) identyfikacja nowych markerów przydatności nasienia do technologii kriokonserwacji, w postaci polimorfizmów DNA w regionach promotorowych genów *STK35* i *IFT27*, wpływających na możliwość wiązania czynników transkrypcyjnych i poziom transkrypcji wyżej wymienionych genów, (**III**) oszacowanie poziomu względnej ekspresji mRNA *ATP1B1* w świeżym nasieniu za pomocą testu RT-qPCR, które może być wykorzystane do selekcji ejakulatów o dobrej przydatności do zamrażania oraz (**IV**) stwierdzenie wyraźnych różnic we względnej ekspresji wybranych białek w plemnikach o dobrej i słabej przydatności do zamrażania co świadczy o udziale tych białek w procesach kriotolerancji plemników.

W podsumowaniu stwierdzamy, że praca doktorska mgr inż. Anny Katarzyny Mańkowskiej spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określonym w Art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2022 r. poz. 574 ze zm.). Podkreślając wysoki poziom rozprawy doktorskiej oraz dorobek naukowy doktorantki wnioskujemy o przyjęcie i dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Promotor
Leyland Fraser
Prof. dr hab. Leyland Fraser

Promotor
Przemysław Sobiech
Prof. dr hab. Przemysław Sobiech

Prof. dr hab. Leyland Fraser
Department of Animal Biochemistry and Biotechnology
Faculty of Animal Bioengineering
University of Warmia and Mazury in Olsztyn

Olsztyn, dn. 21.11.2022

Prof. dr hab. Przemysław Sobiech
Internal Disease Unit, Department of Clinical Sciences,
Faculty of Veterinary Medicine
University of Warmia and Mazury in Olsztyn

SUPERVISORS' OPINION
of the doctoral dissertation by Anna Katarzyna Mańkowska, M.Sc.
entitled "Analysis of DNA polymorphisms and expression of selected genes associated with different freezability of boar spermatozoa"

The thesis comprises three papers, which have been published in highly-reputable scientific journals indexed in JCR. The published papers are as follows:

1. **Mańkowska A.**, Brym P., Paukszto Ł., Jastrzębski J.P., Fraser L. (2020). polymorphisms in boar spermatozoa and their associations with post-thaw quality. International Journal of Molecular Sciences 21 (5), 1902, *https://doi.org/10.3390/ijms21051902* (**IF = 5.924; 140 pts.**)
2. **Mańkowska A.**, Brym P., Sobiech P., Fraser L. (2022). Promoter polymorphisms in *STK35* and *IFT27* genes and their associations with boar sperm freezability. Theriogenology 189, 199-208. *https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.06.023* (**IF = 2.923; 140 pts.**)
3. **Mańkowska A.**, Gilun P., Zasiadczyk Ł., Sobiech P., Fraser L. (2022). Expression of *TXNRD1, HSPA4L* and *ATP1B1* genes associated with the freezability of boar sperm. International Journal of Molecular Sciences 23 (16), 9320. *https://doi.org/10.3390/ijms23169320* (**IF = 6.208; 140 pts.**)

The submitted doctoral dissertation of Anna Katarzyna Mańkowska, M.Sc. is an original scientific work, which addresses the possibility of improving the cryopreservation technology of boar semen through the selection of individuals producing ejaculates with good freezability. This thesis is focused mainly on the identification of genetic markers associated with the freezability of boar semen. It is worth mentioning that the published papers have provided more in-depth information about the genetic markers for semen freezability, and have significantly contributed to the scientific achievements of the PhD Candidate. The scope of the dissertation was mainly based on following aspects: (**I**) identification of SNP markers potentially associated with the quality characteristics of frozen-thawed semen, using KASP genotyping assay, (**II**) identification of DNA sequence polymorphisms in the promoters of *STK35* and *IFT27* genes,

which were differentially expressed in spermatozoa with good and poor freezability, (**III**) analysis of the expression of *TXNRD1, HSPA4L* i *ATP1B1* genes in spermatozoa with different freezability, using RT-qPCR, and (**IV**) comparison of differences in the expression of sperm proteins during the cryopreservation procedure, using different electrophoretic techniques.

The PhD dissertation is well structured and presents elements of novelty regarding the discussed subject matter. Furthermore, the three published scientific articles, along with the synthesis of their results, substantively represent the whole doctoral dissertation as well as fulfilling its requirements. Among the most important accomplishments of the dissertation are as follows: (**I**) KASP genotyping assay and SNP association analysis with sperm traits confirmed that allelic variants in *APPL1, PLBD1, FBXO16, EML5, RAB3C, OXSR1, PRICKLE1* and *MAP3K20* genes are promising markers for post-thaw semen quality, (**II**) identification of potential markers for predicting the freezability of boar spermatozoa as DNA sequence polymorphisms in *STK35* and *IFT27* promoters, which affect the DNA-binding sites for transcription factors and transcriptional activity of the genes, (**III**) RT-qPCR analysis of the relative mRNA *ATP1B1* expression in the fresh semen could be used to select high freezability ejaculates, and (**IV**) confirmed variations in the relative expression of selected proteins in spermatozoa with good and poor freezability ejaculates have reaffirmed the potential roles of the proteins in sperm cryotolerance.

We hereby confirm that the doctoral dissertation of Anna Katarzyna Mańkowska, M.Sc. has fulfilled the requirements stipulated in Art. 187 of the Act of 20 July, 2018 (Law on Higher Education and Science (Journal of Laws 2022, item 574 as amended). Taking into account the high scientific value of the dissertation and academic achievements of Anna Katarzyna Mańkowska, M.Sc., we would like to recommend her for further participation at subsequent stages of the doctoral procedure.

Promotor
Leyland Fraser
Prof. dr hab. Leyland Fraser

Promotor
Prof. dr hab. Przemysław Sobiech
Przemysław Sobiech