prof. dr hab. Wojciech Niżański

Wrocław, 15.01.2023 r.

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

wykonanej
w Katedrze Biochemii i Biotechnologii Zwierząt
Wydziału Bioinżynierii Zwierząt
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

pod kierunkiem dr hab. Leylanda Frasera oraz prof. dr hab. Przemysława Sobiecha.

Podstawa formalna opracowania recenzji

Recenzję przedłożonej rozprawy doktorskiej wykonano w odpowiedzi na pismo Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego z dnia 21 listopada 2022 prof. Dr hab. Tomasza Daszkiewicza, na podstawie uchwały Rady Naukowej Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo UWM w Olsztynie z dnia 27 października 2022 r.

Ocena formalna przedłożonej rozprawy doktorskiej

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w Katedrze Biochemii i Biotechnologii Zwierząt Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie pod kierunkiem prof. dr hab. Leylanda Frasera oraz drugiego promotora w osobie prof. dr hab. Przemysława Sobiecha. Rozprawa mgr inż. Anny Katarzyny Mańkowskiej oparta została na trzech spójnych tematycznie oryginalnych pracach naukowych opublikowanych w latach 2020-2022, w czasopismach z listy Journal Citation Reports o wysokiej reputacji naukowej. Dwie prace opublikowano w International Journal of Molecular Sciences i jedną w Theriogenology. Sumaryczny Impact Factor prac to 15,055, a liczba punktów MEiN to 420. Wartości te są bardzo wysokie w odniesieniu do młodego naukowca. Opublikowanie prac w renomowanych czasopismach o wysokim współczynniku wpływu świadczy samo w sobie o solidności naukowej przedłożonego opracowania. We wszystkich publikacjach doktorantka figuruje jako pierwszy autor o wiodącym wkładzie w powstanie pracy, z uwzględnieniem opracowania koncepcji badań, metodologii, metodyki, analizy formalnej warunków prowadzenia badań, prowadzenia eksperymentów, opracowania wyników, tekstu i przygotowania manuskryptu. Prace są dziełem czterech do pięciu współautorów. Większość z nich to pracownicy innych Katedr UWM oraz Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN. Pochodzenie współautorów z innych Katedr i innej jednostki świadczy o umiejętności Kandydatki do realizacji pracy w zespole składającym się z reprezentantów różnych specjalności. Badania prowadzono w ramach realizacji projektu finansowanego z Narodowego Centrum Nauki (2015/19/B/NZ9/01333) oraz stypendium doktorskiego w ramach Programu

Interdyscyplinarnej Szkoły Doktorskiej Bioekonomia (POWR.03.02.00-00-1034/16.00 finansowanej z Europejskiego Funduszu Społecznego.

Publikacje wchodzące w skład pracy doktorskiej:

1. Mańkowska A., Brym P., Paukszto Ł., Jastrzębski J.P., Fraser L. (2020). Gene polymorphisms in boar spermatozoa and their associations with post-thaw semen quality. International Journal of Molecular Sciences 21, 1902 (IF = 5.924; 140 pkt MEiN)

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 (IF = 2.923; 140 pkt MEiN)

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. (IF = 6.208; 140 pkt MEiN)

Na pracę doktorską, oprócz wymienionych publikacji, składa się syntetyczne opracowanie zawierające: streszczenie w języku polskim i angielskim, listę skrótów, ogólne wprowadzenie, cele pracy, materiały i metody, opis kolejnych publikacji, wnioski oraz spis piśmiennictwa. W pracy znalazły się również deklaracje współautorów o ich udziale w pracach badawczych. Taką formę rozprawy dopuszcza art.187 ust. 3 ustawy o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z dnia 20 lipca 2018 r. oraz wytyczne Rady Doskonałości Naukowej (Komunikat 19/2020 z dnia 9 listopada 2020 r.).

Tematyka rozprawy

Kriokonserwacja plemników jest jedną z najważniejszych biotechnik rozrodu stosowaną w praktyce. Przechowywanie dawek inseminacyjnych w niskich temperaturach pozwala na prowadzenie racjonalnej reprodukcji. Możliwość długoterminowego zdeponowania nasienia cennych genetycznie samców na wiele lat oraz jego transportu i sukcesywnego wykorzystania oraz uniezależnienie czasowe procesów konserwacji i sztucznej inseminacji dają sposobność tworzenia rezerwy genetycznej pozwalającej uzyskać optymalny postęp w hodowli oraz zapewnić bioróżnorodność genetyczną populacji. Plemniki knura cechują się wśród innych gatunków niską podatnością na proces mrożenia-rozmrażania. Stąd też przez wiele lat trwają badania nad optymalizacją procesu kriokonserwacji, w taki sposób, aby możliwe stało się komercyjne wykorzystanie dawek inseminacyjnych składowanych w niskich temperaturach. Innym istotnym zagadnieniem dotyczącym wszystkich gatunków, ale nabierającym szczególnego znaczenia w kontekście niskiej efektywności mrożenia jest zjawisko zróżnicowanej osobniczo zamrażalności męskich gamet (tzw. freezability). W populacji określonego gatunku zwierząt istnieją osobniki o niskiej i wysokiej podatności plemników na proces kriokonserwacji (z ang. good freezers i bad freezers). Wykorzystanie tej samej procedury konserwacji w niskich temperaturach skutkuje uzyskiwaniem u niektórych samców nasienia o wysokiej jakości po rozmrożeniu a u innych samców nasienia o niespodziewanie niskich jakości po mrożeniu-rozmrożeniu. Zatem przydatność plemników do kriokonserwacji jest różna i jest to w dużym stopniu cecha osobnicza. We wstępnym etapie selekcji zwierząt do rozrodu bierzemy pod uwagę odpowiedni wiek zwierząt z odrzuceniem osobników zbyt młodych i zbyt zaawansowanych wiekiem, gdzie pewna labilność strukturalno-metaboliczna gamet pogarsza zwykle jakość porozmrożeniową dawek inseminacyjnych. Odrzucamy także

nasienie samców wytwarzających gamety o słabej jakości biologicznej, co jest widoczne najczęściej od razu, tuż po jego pobraniu. Jednak i to nie pozwala na wykrycie osobników o dużej i niskiej podatności na proces mrożenia-rozmrażania. W wielu przypadkach bowiem nasienie imponującej wręcz jakości początkowej nie poddaje się procesowi kriokonserwacji w zamierzony sposób i porozmrożeniowo uzyskujemy nasienie o niespodziewanie niskiej jakości. Istnieją dwa kierunki badań nad kontrolą tego zjawiska. Jeden z nich dotyczy personalizacji tj dostosowania metody mrożenia do danego osobnika, w taki sposób, aby dobrać do cech jego nasienia metodę optymalną. Z drugiej strony od lat trwają badania w obszarze poszukiwania dobrych wskaźników zamrażalności, takich które pozwoliłyby zdefiniować jeszcze przed mrożeniem, jaki będzie wynik kriokonserwacji w danym przypadku i czy nasienie określonego osobnika nadaje się do wdrożenia procedur technik wspomagania rozrodu. Na tym polu prowadzone są badania nad przydatnością w tym celu oceny morfologicznej plemników, komputerowej oceny ruchliwości plemników, badań nad rozdziałem populacji plemników o rożnej aktywności ruchowej, analizy aktywności enzymów w środowisku zewnątrz- i wewnątrzkomórkowym, czy proteomiki. Wszystkie powyższe badania pozwoliły na uzyskanie jedynie ograniczonego postępu w omawianym obszarze. Wciąż nie istnieją niezawodne metody selekcji ejakulatów i samców w kontekście podatności gamet na proces kriokonserwacji.

Zaproponowanie w ocenianej pracy wykorzystania zaawansowanych badań genetycznych w tym aspekcie jest pomysłem kreatywnym i nowym oraz daje nadzieję na uzyskanie innowacyjnych i skutecznych rozwiązań. Należy też zwrócić uwagę, że diagnostyka genetyczna umożliwić może w przyszłości nie tylko prowadzenie selekcji w oparciu o badania nasienia, ale też w oparciu o badanie innego materiału biologicznego pochodzącego od reproduktora, co umożliwi dobór zwierząt do rozrodu bez konieczności oczekiwania na osiągnięcie wieku przydatności reprodukcyjnej.

W przedłożonej pracy zaproponowano wykorzystanie zaawansowanych badań genetycznych męskich gamet z uwzględnieniem sekwencjonowania nowej generacji, porównania modeli transkryptomicznych oraz badań nad ekspresją wybranych genów i białek w celu określenia potencjalnych markerów podatności plemników określonego knura na proces kriokonserwacji. Tematyka pracy jest zatem niezwykle aktualna i ciekawa zarówno w kontekście poznawczym jak i aplikacyjnym.

Ocena merytoryczna

W ogólnym wprowadzeniu Autorka zbudowała syntetyczny a zarazem ciekawy opis stanu wiedzy w obszarze badań będącym przedmiotem opracowania. Przytacza dane dotyczące przydatności technologii mrożenia w hodowli zwierząt i zróżnicowanej zamrażalności plemników knura. Opisuje również zwięźle przesłanki, które skłoniły Ją do przeprowadzenia badań. Przytacza piśmiennictwo wskazujące, iż zróżnicowanie genetyczne wywiera istotny wpływ na zamrażalność plemników a polimorfizm genów wpływa na właściwości nasienia knurów i istnieją dane wskazujące, że jego analiza może być wykorzystana jako marker jakości nasienia. Ponadto Autorka wskazuje na inne zjawisko o potencjalnym znaczeniu. Miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych są powiązane z polimorfizmem regionu promotorowego genów. Istnieje więc związek pomiędzy nimi a aktywnością transkrypcyjną, co może być powiązane z kriokotolerancją komórek. Autorka przytacza dotychczas opublikowane dane świadczące o tym, że zmiany profilu ekspresji genów związane z oddziaływaniami kriogenicznymi mogą być wykorzystane jako markery jakości nasienia.

Autorka stawia tezę, która w uproszczeniu brzmi następująco: identyfikacja molekularnych, genetycznych markerów powiązanych z funkcją plemników może pozwolić na wykrycie wskaźników podatności na kriokonserwację, a ich znalezienie przyczyni się do poprawy efektywności procesu mrożenia-rozmrażania nasienia knura.

Cele szczegółowe to:

1. wykorzystanie analizy polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNP) typu *variant calling* w plemnikach knura,
2. walidacja wybranych markerów SNP przy wykorzystaniu techniki KASP (z ang. Competitive Allele Specific PCR),
3. badanie związku pomiędzy polimorfizmem genów a właściwościami plemników rozmrożonych,
4. identyfikacja polimorfizmów w obrębie promotorów genu STK53 i IFT27 w plemnikach o wysokiej i niskiej zamrażalności i analiza ich wpływu na zdolność wiązania czynników transkrypcyjnych,
5. analiza ekspresji mRNA *TXNRD1, HSPA4L i ATP1B1* w plemnikach przed mrożeniem i po rozmrożeniu u knurów wykazujących różną zamrażalność nasienia,
6. określenie ekspresji białek analizowanych genów w plemnikach nasienia świeżego i rozmrożonego oraz identyfikacja profili elektroforetycznych białek w ejakulatach o różnej podatności na mrożenie-rozmrażanie.

Cele sformułowane są poprawnie a ich realizacja, jak wspomniano, posiada znaczenie w kontekście nie tylko poznawczym, ale też aplikacyjnym.

Przedstawiony przez Kandydatkę cykl trzech prac jest spójnym opracowaniem obejmującym realizację wymienionych celów. W kolejnych publikacjach przeprowadzono badania na 40, 11 i 10 knurach. Nasienie poddawano kriokonserwacji wg standardowej technologii stosowanej w ośrodku olsztyńskim. Mrożenie prowadzono w sposób kontrolowany w programowanym freezerze a rozmrażanie każdorazowo w tych samych warunkach. Przeprowadzono zaawansowaną ocenę nasienia. Ruchliwość poddawano ocenie subiektywnie a oprócz tego oznaczano różnorodne parametry opisujące ruch plemników za pomocą analizy CASA. Prowadzono również zaawansowana ocenę właściwości strukturalno-czynnościowych plemników m.in. z wykorzystaniem fluorochromów z uwzględnieniem aktywności mitochondriów (JC-1/PI), ciągłości błony komórkowej (SYBR-14/PI), ciągłości akrosomu , fragmentacji DNA (Comet Assay) oraz peroksydacji lipidów (LPO).

Powyższe badania są jednak niejako tłem, punktem odniesienia dla wyników uzyskanych z zastosowaniem nowoczesnych badań genetycznych z włączeniem techniki wysokoprzepustowej.

W pierwszej publikacji cyklu *(International Journal of Molecular Sciences)* wykorzystano dane sekwencjonowania RNA uzyskane podczas porównania profili transkryptomicznych plemników knura o różnej podatności na proces kriokonserwacji. Analizowano polimorfizm pojedynczego nukleotydu przy wykorzystaniu metody *variant calling*. Przeprowadzono również opis bioinformatyczny Gene Ontology (GO). Do genotypowania populacji knurów wykorzystano technologię KASP. Zidentyfikowano ponad 1000 polimorfizmów pojedynczych nukleotydów i wykazano, że większość z nich znajdowała się w rejonach 3'-niepodlegających translacji (3'-UTR)

sekwencjonowanych transkryptów plemnikowych. Czterdzieści z wykrytych SNP zostało wykorzystanych w badaniach populacyjno-asocjacyjnych podczas których analizowano zależności pomiędzy genotypami poszczególnych loci z wybranymi parametrami jakości porozmrożeniowej nasienia. Ta analiza potwierdziła związki pomiędzy polimorfizmem SNP w genach: APPL1, PLBD1, FBXO16, EML5, RAB3C, OXSR1, PRICKLE1, MAP3K20 a właściwościami plemników po rozmrożeniu. Powyższe geny można traktować jako potencjalne markery genetyczne jakości nasienia i jego przydatności do konserwacji w niskich temperaturach.

Praca jest niezwykle ciekawa i charakteryzuje się kompleksowym podejściem do omawianych zagadnień. Prowadzenie tego rodzaju badań wymaga ogromnej wiedzy z zakresu biologii, andrologii, kriobiologii oraz przede wszystkim genetyki. Budzi to uznanie. Zastosowana metodyka jest niezwykle zaawansowana i nowoczesna. Poprzez zestawienie wyników badania seminologicznego z dogłębną analizą genetyczną osiągnięto postęp w reprezentowanym obszarze nauki i uzyskano nowe dane. Oprócz powyższego, należy podkreślić niezwykle rzetelne i szczegółowe dane metodyczne i obszerne wyniki opublikowane w pracy. Dyskusja publikacji jest bardzo ciekawa, napisana świadomym językiem naukowym i świadczy o dużej wiedzy Autorki.

W pracy brakuje mi szczegółów dotyczących przeszłości reprodukcyjnej knurów. Nie znalazłem też informacji o wieku badanych samców. Oba te czynniki są ważne w kontekście zamrażalności i jakości nasienia. Ich uwzględnienie mogłoby przyczynić się być może do wskazania pewnych zależności przydatnych dla praktyki. Autorka za wartość graniczną pomiędzy ejakulatami knurów o dobrej i złej zamrażalności przyjęła wartość ruchliwości na poziomie 30%, ruchliwości ocenianej jak rozumiem metodą subiektywną. Uważam, że skoro Autorka stosuje tak zaawansowane metody analizy genetycznej i seminologicznej, to należałoby się zastanowić, czy kryteria podziału na nasienie o dobrej i złej zamrażalności nie powinno opierać się na algorytmie uwzględniającym analizę CASA oraz wyniki zaawansowanej oceny właściwości strukturalno-funkcjonalnych gamet, jak np. integralność błon i aktywność mitochondrialna. Niezależnie od powyższych uwag pierwszą pracę cyklu uważam za wybitną.

W drugiej pracy *(Theriogenology)* poddano analizie związek pomiędzy polimorfizmami DNA w sekwencjach 5'-flankujących genów STK35 (czynność związana z reakcją na bodźce stresowe i termiczne) i IFT27 (funkcjonalnie powiązany z ruchliwością plemników) a zróżnicowaną ekspresją białek STK35 i IFT27 w nasieniu samców *good freezers i bad freezers*. W pracy tej zastosowano sekwencjonowanie I generacji wg Sangera. Analizę genetyczną uzupełniono o analizę ekspresji białek. Zastosowano podobne metody oceny i klasyfikacji zamrażalności nasienia, jak w pracy pierwszej. Badania ruchliwości plemników uzupełniono o szczegółową analizę CASA. Zidentyfikowano w obrębie promotora genu STK35 obecność tranzycji C >T (rs327863835). W promotorze genu IFT27 zidentyfikowano obecność dwóch substytucji A > T i T > C (rs 337563873; rs331520020). Wykazano różnice we frekwencji poszczególnych alleli promotorów pomiędzy porównywanymi grupami knurów. Analizy bioinformatyczne wykazały, że określone mutacje badanych promotorów mogą prowadzić do postania dodatkowych miejsc wiązania dla czynników transkrypcyjnych. To z kolei może różnicować poziom ekspresji STK35 i IFT27, co może być przyczyną różnej podatności nasienia na proces kriokonserwacji. Stwierdzono różnice w ekspresji obu białek w nasieniu świeżym i rozmrożonym.

Wykazano też, że ekspresja białka IFT27 była wyższa po rozmrożeniu w grupie o dobrej podatności na mrożenie. Wyniki pracy wskazują, że warianty alleliczne obu genów mogą stanowić potencjalne markery genetyczne przydatności nasienia knura do kriokonserwacji.

Trzecia praca *(International Journal of Molecular Sciences)* to niejako uzupełnienie poprzednich opracowań. Tu zastosowano analizę ekspresji genów za pomocą RT-qPCR oraz analizę ekspresji białek metodą Western Blot. Równocześnie podobnie jak w poprzednich pracach podzielono knury na samce, których nasienie jest podatne (n=5) i samce, których nasienie nie jest podatne (n=5) na kriokonserwację w oparciu o wartość graniczną (TMOT 30%) ruchliwości ocenianej subiektywnie. Badano ekspresję genów i białek związanych ze stresem: TXNRD1 (reduktaza tioredoksyny-1), HSPA4L (rodzina A 4-like białka szoku termicznego) i ATP1B1 (jednostka beta-1 ATP-azy transportowej sód/potas). Praca wykazała szereg ciekawych zależności. Wg mnie niezwykle interesujące jest to, iż w świeżym nasieniu o dobrej zamrażalności obserwuje się wyższą ekspresję białka TXNRD1oraz istotnie wyższy poziom ekspresji mRNA ATP1B1. Zatem wydaje się, że właściwość ta ma potencjał jako marker kriotolerancji nasienia. Opis badań, uzyskanych wyników i dyskusja są ciekawe i świadczą o znajomości omawianej tematyki. Zarówno ta praca, jak i poprzednie noszą wiele cech nowatorstwa. Uzyskano bowiem wyniki dotyczące analizy genetycznej w powiązaniu z oceną nasienia w grupie *good freezers i bad freezers,* które stanowią nowy i istotny wkład w poruszany obszar specjalizacji naukowej. Wreszcie godna podkreślenia jest komplementarność prowadzonych badań, gdzie zastosowano techniki analizy nasienia, które się wzajemnie uzupełniają. Wielką zaletą pracy jest zastosowanie technik wysokoprzepustowych i analizy bioinformatycznej (GO) w zestawieniu z zaawansowanymi i rzetelnymi badaniami seminologicznymi.

Wszystkie artykuły wchodzące w skład rozprawy doktorskiej, zostały opublikowane w renomowanych, recenzowanych czasopismach a uzyskane wyniki i forma ich prezentacji zostały zaakceptowane przez niezależnych ekspertów w reprezentowanej specjalności. Świadczy to o dużym znaczeniu badań i ich wysokiej jakości.

Wnioski z pracy sformułowane przez Autorkę:

1. analiza KASP i SNP e warianty alleli genów APPL1, PLBD1, FBXO16, EML5, RAB3C, OSXR1, PRICKLE1 i MAP3K20 są obiecującymi markerami porozmrożeniowej jakości nasienia knura,
2. polimorfizm w obrębie promotora genu STK35 i IFT27 w ejakulatach o dobrej i złej zamrażalności powoduje tworzenie nowych miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych, co może regulować aktywność transkrypcyjną genów. Warianty alleliczne obu genów mogą być brane pod uwagę, jako potencjalne markery zamrażalności plemników knura,
3. ekspresja mRNA ATP1B1 w świeżych ejakulatach oceniana za pomocą RT-qPCR może być wykorzystana do selekcji ejakulatów o wysokiej zamrażalności,
4. istotne zróżnicowanie ekspresji białek STK35, IFT27, TXNRD1, HSPA4L i ATP1B1 pomiędzy ejakulatami o dobrej i złej zamrażalności wskazuje na prawdopodobną rolę tych białek w kriotolerancji plemników knura

Wnioski sformułowane są prawidłowo. Autorka wybrała z ogromu udowodnionych zależności zagadnienia najważniejsze i/lub te, które mogą posiadać znaczenie aplikacyjne w przyszłości.

Podsumowanie oceny pracy:

Do szczególnych zalet przedłożonej pracy zaliczam:

- bardzo dobry cykl komplementarnych, dobrze przemyślanych i niezwykle profesjonalnie opracowanych trzech publikacji
- dobry język naukowy i dyskusja w publikacjach
- zaawansowane metody analizy genetycznej i bioinformatycznej wymagające szerokiej wiedzy, ale też ogromnej pracowitości i skrupulatności
- nowatorski charakter prac i istotność uzyskanych wyników dla specjalności naukowej
- rezultaty o potencjale aplikacyjnym, które mogą być pomocne w praktyce weterynaryjnej i hodowlanej

Z drugiej strony moje uwagi na temat pracy, które przytoczyłem powyżej to:

- dość prosty w stosunku do metodyki badań sposób podziału ejakulatów na te o dobrej i złej zamrażalności w oparciu o subiektywną ocenę ruchliwości
- brak danych dotyczących wieku knurów w jednej z prac

Uwagi końcowe:

Recenzowana praca doktorska mgr inż. Anny Katarzyny Mańkowskiej, wykonana jest z zachowaniem właściwej i zaawansowanej metodyki, temat pracy jest istotny dla rozwoju reprezentowanej Dyscypliny, a przy tym posiada duży potencjał aplikacyjny. Doktorantka wykorzystała w pracy szeroki wachlarz technik badawczych, świadczący o Jej wysokich kompetencjach naukowych.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr inż. Anny Katarzyny Mańkowskiej jest prawidłowo opracowanym metodycznie, formalnie i edytorsko oryginalnym osiągnięciem naukowym wnoszącym istotny wkład w rozwój reprezentowanej Dyscypliny i spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz. U. z 2022 r. poz. 574 ze zm). Na tej podstawie wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie Autorki rozprawy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto z uwagi na zastosowaną niezwykle zaawansowaną metodykę pracy, osiągnięte nowatorskie wyniki, znajdujące zastosowanie aplikacyjne i stanowiące istotny krok w przyszłość w obszarze rozród zwierząt oraz komplementarny charakter eksperymentu uwzgledniający zaawansowaną ocenę nasienia, techniki wysokoprzepustowe i analizę bioinformatyczną uważam pracę za wybitną i świadczącą o wysokich kompetencjach Doktorantki. Wnoszę zatem o wyróżnienie pracy stosowną Nagrodą w Uniwersytecie Warmińsko-Mazurskim.

Wojciech Niżański
KIEROWNIK
Katedry Rozrodu
z Kliniką Zwierząt Gospodarskich

prof. dr hab. Wojciech Niżański

prof. dr hab. Wojciech Niżański Wrocław, January 15th 2023

A Review
of the Doctoral Thesis of Anna Katarzyna Mańkowska, MSc. Eng.
entitled "Analysis of DNA polymorphisms and expression of selected genes associated with different freezability of boar spermatozoa"
conducted at the Department of Animal Biochemistry and Biotechnology
Faculty of Animal Bioengineering
University of Warmia and Maury in Olsztyn
under the supervision of prof. dr hab. Leyland Fraser and prof. dr hab. Przemysław Sobiech

Formal basis for the review

The review of the submitted doctoral dissertation was carried out in response to the letter of the Chairman of the Scientific Council of the Discipline of Zootechnics and Fisheries of the University of Warmia and Mazury of 21 November 2022 by Prof. Tomasz Daszkiewicz, based on the resolution of the Scientific Council of the Discipline of Zootechnics and Fisheries of the UWM in Olsztyn of 27 October 2022.

Formal evaluation of the submitted Doctoral Thesis

The doctoral dissertation submitted for review was carried out at the Department of Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Animal Bioengineering of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn under the supervision of prof. Leyland Fraser and the second supervisor prof. Przemysław Sobiech. Anna Katarzyna Mańkowska's dissertation was based on three thematically coherent original scientific papers published in the years 2020-2022, in journals of a high scientific reputation listed in the Journal Citation Report. Two papers were published in the International Journal of Molecular Sciences and one in Theriogenology. The total Impact Factor of the work is 15.055, and the number of MEiN points is 420.

These values are very high in considering the fact that are achieved by a young scientist. The publication of papers in reputable journals with a high scientific impact proves in itself the scientific reliability of the submitted study. In all publications, the Candidate is listed as the first author with a leading contribution to the realization of the work, including the development of research concepts, methodology, formal analysis of the conditions for conducting research, conducting experiments, developing results, text writing and preparing a manuscript. Four to five co-authors are listed in all three papers. Most of them are employees of other Departments of the UWM and the Institute of Animal Reproduction and Food Research of the Polish Academy of Sciences. The origin of co-authors from other Departments and another units proves the Candidate's ability to work in a team consisting of representatives of various specialties. The research was conducted as part of a project financed by the National Science Centre (2015/19/B/NZ9/01333) and a doctoral scholarship under the Programme of the Interdisciplinary Doctoral School Bioeconomics (POWR.03.02.00-00-1034/16.00 financed by the European Social Funds.

Publications included in the doctoral Thesis:

1. Mańkowska A., Brym P., Paukszto Ł., Jastrzębski J.P., Fraser L. (2020). Gene polymorphisms in boar spermatozoa and their associations with post-thaw semen quality. International Journal of Molecular Sciences 21, 1902 (IF = 5.924; 140 pkt MEiN)

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 (IF = 2.923; 140 pkt MEiN)

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. (IF = 6.208; 140 pkt MEiN)

The doctoral dissertation, in addition to the above-mentioned publications, consists of a synthetic description containing: a summary in Polish and English, a list of abbreviations, a general introduction, the aims of the work, materials and methods, a description of three included publications, conclusions and a list of references. The paper also includes declarations of co-authors about their participation in research work. This form of dissertation is allowed by Article 187(3) of the Act on Higher Education and Science of 20 July 2018 and the guidelines of the Council for Scientific Excellence (Communication 19/2020 of 9 November 2020).

Scope of the Thesis

Sperm cryopreservation is one of the most important reproductive biotechniques used in practice. Storage of insemination doses at low temperatures allows for rational reproduction. The possibility of long-term deposition for many years and the transport and use of semen of genetically valuable males as needed, as well as the time independence of preservation and artificial insemination processes, provide an opportunity to create a genetic reserve to achieve optimal progress in breeding and ensure the genetic biodiversity of the population. Boar sperm are characterized by low freezability among other species. Therefore, for many years, research has been underway to optimize the cryopreservation process in such a way that it becomes possible to commercially use insemination doses stored at low temperatures. Another important issue concerning all species, but gaining particular importance in the context of low freezing efficiency, is the phenomenon of intra- and inter-species differences of sperm susceptibility to cryodamage. In the population of a specific animal species, there are individuals with sperm of low and high susceptibility to the cryopreservation process (so called: good freezers and bad freezers). The use of the same procedure of preservation in low-temperatures results in some males producing high-quality semen unexpectedly low sperm quality after freezing-thawing. Thus, the usefulness of sperm for cryopreservation varies, and this is largely an individual trait. In the initial stage of selection of animals for breeding, we take into account the appropriate age of animals with the rejection of individuals too young and too advanced in age, where a certain structural and metabolic lability of gametes usually worsens the post-thawing quality of insemination doses. We also reject semen of males producing gametes of poor biological quality, which is usually visible immediately, just after its collection. However, even this does not allow to detect individuals with high and low susceptibility to the freezing-thawing process. In many cases, semen of impressive initial quality is hard to preserve with success cause after thawing we obtain semen of unexpectedly low quality. There are two directions of research here. One of them concerns personalization, i.e. adjusting the freezing method to a given

individual, in such a way as to choose the optimal method for the characteristics of its semen. On the other hand, research has been undertaken on the field of searching for freezability markers, such that would allow to define before freezing what will be the result of cryopreservation in a given case and whether the semen of a specific individual is suitable for the implementation of procedures of Assisted Reproduction Techniques. In this area, research is carried out on the usefulness of morphological assessment of sperm, computer assessment of sperm motility, research on the separation of sperm populations with different motion activity, analysis of enzyme activity in extra- and intracellular compartment, or proteomics. All the above studies have allowed for limited progress in this area. There are still no reliable methods for selecting ejaculates and males in the context of gamete susceptibility to cryodamage.

Proposal the use of advanced genetic research in this aspect in the evaluated work is a creative and new idea and gives hope for obtaining innovative and effective solutions. It should also be noted that genetic diagnostics may in the future enable not only selection based on semen tests, but also on the basis of testing of other biological material from the sire, which will enable the selection of animals for breeding without having to wait for reaching the age of reproductive usefulness.

The submitted paper proposes the use of advanced genetic studies of male gametes, including Next-Generation Sequencing, comparison of transcriptomic models and studies on the expression of selected genes and proteins to determine potential markers of sperm susceptibility of a specific boar to the cryopreservation process. The subject matter of the work is therefore currently demanded and interesting both in the basic and applicative context.

Detailed evaluation of Dissertation

In the text of general introduction, the author has built a synthetic and interesting description of the state of knowledge in the discussed area of research. She cites data on the usefulness of freezing technology in breeding and individual differences in ability to freeze of boar sperm. She also describes the reasons that led her to carry out her research. Candidate cites literature indicating that genetic diversity has a significant impact on sperm freezability and gene polymorphism affects boar semen properties and there are data indicating that it can be used as a marker of sperm quality. In addition, it points to another phenomenon of potential importance. The binding sites of transcription factors are associated with the polymorphism of the promoter region of genes. So there is a relationship between them and transcriptional activity, which may be related to cryotolerance of cells. The Author cites previously published data showing that changes in the gene expression profile associated with cryogenic interactions can be used as markers of sperm quality.

Author puts forward the thesis, which in simple terms may be presented as follows: the identification of molecular, genetic markers associated with sperm function may allow the detection of indicators of susceptibility to cryodamage/markers of freezability, and their finding will contribute to improving the efficiency of the boar sperm freezing-thawing process.

Specific aims of the study include:

1. employ variant calling analysis to identify SNPs in genes expressed in boar spermatozoa,
2. validate selected SNP markers using the KASP genotyping assay,
3. investigate the associations of gene polymorphisms with the quality characteristics of frozen-thawed (FT) spermatozoa,

4. identify polymorphisms in the promoters of *STK35* and *IFT27* genes of spermatozoa with good and poor freezability, and to predict their effect on the binding ability of TFs,
5. analyze *TXNRD1*, *HSPA4L* and *ATP1B1* mRNA expression in the fresh pre-freeze (PF) and FT spermatozoa from boars differing in freezability, and
6. determine the protein expression of the analyzed genes in the fresh PF and FT spermatozoa, and to identify the electrophoretic profiles of the proteins in ejaculates with different freezability.

The aims are formulated correctly and their implementation, as mentioned, is important not only in the basic context, but also in the applicative one.

The cycle of three works presented by the Candidate is a coherent study covering the implementation of these aims. In subsequent publications, studies were carried out on 40, 11 and 10 boars. Semen was subjected to cryopreservation according to the standard technology used in the Olsztyn Center. Freezing was carried out in a controlled way in a programmed freezer and thawing each time under the same conditions. Advanced semen evaluation was performed. Motility was assessed subjectively and various parameters describing sperm motion characteristic were determined using CASA analysis. Advanced assessment of structural and functional properties of sperm was also conducted e.g. using fluorochromes: mitochondrial activity (JC-1/PI), plasma membrane integrity (SYBR-14/PI), acrosome integrity, DNA fragmentation (Comet Assay), as well as colorimetric TBARS assessment of lipid peroxidation (LPO).

However, the above methods constitute a kind of background, a reference point for the results obtained using modern genetic tests including high-throughput technology.

The first publication of the series *(International Journal of Molecular Sciences)* used RNA sequencing data obtained during the comparison of transcriptomic profiles of boar sperm with different susceptibility to the cryopreservation process. Single nucleotide polymorphism (SNP) was analysed using *the variant calling* method. A bioinformatic description of Gene Ontology (GO) was also performed. KASP technology was used to genotyping the boar population. More than 1,000 single nucleotide polymorphisms were identified and most of them were found to be in regions of 3'-untranslated (3'-UTR) sequenced sperm transcripts. Forty of the detected SNPs were used in population-association studies, during which the relationships between the genotypes of individual loci with selected parameters of post-thawing semen quality were analyzed. This analysis confirmed the relationship between SNP polymorphism in the genes: APPL1, PLBD1, FBXO16, EML5, RAB3C, OXSR1, PRICKLE1, MAP3K20 and sperm properties after thawing. These genes can be treated as potential genetic markers of sperm quality and its suitability for preservation at low temperatures.

The work is interesting and is characterized by a comprehensive approach to the issues discussed. Conducting this type of research requires extensive knowledge in the field of biology, andrology, cryobiology and, above all, genetics. This is commendable. The applied methodology is advanced and modern. By combining the results of the seminological examination with in-depth genetic analysis, progress was made in the area of knowledge and new data were obtained. In addition to the above, it is necessary to emphasize the extremely reliable and detailed methodological data and results published in the work. The discussion of the publication is very interesting, written in a conscious scientific language and testifies to the great knowledge of the author.

I miss details about boars' reproductive history. I also did not find information about the age of the examined boars. Both of these factors are important in the context of freezing and sperm quality. Their inclusion could perhaps contribute to the identification of certain relationships useful for practice. The cut-off value between the ejaculates of good and bad freezer boars took the value of motility at the level of 30%. As I understand it was assessed by the subjective method. I believe, that since the Author uses such advanced methods of genetic and seminological analysis, one should consider whether the criteria for selection between semen with good and bad freezability should be based on an algorithm that takes into account the CASA analysis and the results of advanced assessment of the structural and functional properties of gametes, such as membrane integrity and mitochondrial activity. Regardless of the above remarks, I consider the first work of the cycle to be outstanding.

The second study (*Theriogenology*) analyzed the relationship between DNA polymorphisms in the sequences of 5'-flanking genes STK35 (activity related to response to stress and heat) and IFT27 (functionally related to sperm motility) and differential expression of STK35 and IFT27 proteins in the semen of *good freezers and bad freezers males*. In this work, first generation sequencing according to Sanger was used. Genetic analysis was supplemented by protein expression analysis. Similar methods of semen assessment and classification of boars' semen freezability were used as in the first paper. Sperm motility assessment were completed with a detailed CASA analysis. The presence of C>T transition (rs327863835) was identified within the promoter of the STK35 gene. In the promoter of the IFT27 gene, the presence of two substitutions A > T and T > C (rs 337563873; rs331520020) was identified. Differences in the frequency of individual promoter alleles between the compared groups of boars were demonstrated. Bioinformatic analyses have shown that specific mutations of the investigated promoters can lead to the formation of additional binding sites for transcription factors. This, in turn, may differentiate the level of expression of STK35 and IFT27, which may be the cause of different susceptibility of sperm to the cryopreservation process. Differences in the expression of both proteins were found in fresh and thawed semen. It was also shown that the expression of IFT27 protein was higher after thawing in the group with good susceptibility to freezing. The results of the study indicate that allelic variants of both genes may be potential genetic markers of the suitability of boar sperm for cryopreservation.

The third paper *(International Journal of Molecular Sciences)* is a kind of methodological complement to previous studies. Here, gene expression analysis using RT-qPCR and Western Blot protein expression analysis were used. At the same time, as in previous work, boars were divided into males whose semen is susceptible (n=5) and males whose semen is not susceptible (n=5) to cryodamage based on a limit value (TMOT 30%) of motility assessed subjectively. The expression of stress-related genes and proteins was studied: TXNRD1 (thioredoxin reductase-1), HSPA4L (Heat Shock Protein family A, member 4-like) and ATP1B1 (ATPase Na+/K+ transporting beta-1 polypeptide). The work showed a number of interesting relationships. In my opinion, it is worthy to note some results e.g. that in fresh semen with good freezability, a higher expression of TXNRD1 protein is observed. In addition, a significantly higher level of ATP1B1 mRNA expression was demonstrated in fresh semen with good freezability. Thus, this property seems to have potential as a marker of sperm cryotolerance. The description of the research, the results obtained and the discussion are interesting and testify to the knowledge of the Author on the discussed topics. Both this work and the previous ones bear many features of innovation. The results of genetic analysis in connection with semen evaluation in the *group of good freezers and bad freezers* were obtained, which constitute a new and interesting contribution to the discussed area of scientific specialization. Finally, it is worth emphasizing the complementarity of the conducted research,

where semen analysis techniques were used, which complement each other. The great advantage of the work is the use of high-throughput techniques and bioinformatic analysis (GO) in combination with advanced and reliable seminological assessment.

Due to the fact that all articles included in the doctoral dissertation have been published in peer-reviewed journals of high reputation, the results obtained and the form of their presentation have been accepted by other experts in this field. This demonstrates the great importance of research and its high quality.

Conclusions formulated by the Author:

1. 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.
2. Polymorphisms in the promoter regions of the differentially expressed *STK35* and *IFT27* in good and poor freezability ejaculates resulted in the generation of additional DNA-binding sites for transcription factors, which might regulate the transcriptional activity of the genes. The allelic variants in *STK35* and *IFT27* could be considered as potential markers for predicting the freezability of boar spermatozoa.
3. Relative mRNA *ATP1B1* expression in the fresh semen analyzed by RT-qPCR could be used to select high freezability ejaculates.
4. Significant variations in the relative protein expression of STK35, IFT27, TXNRD1, HSPA4L and ATP1B1 between the good and poor freezability ejaculates reaffirm the potential roles of these proteins in sperm cryotolerance.

Conclusions are correct. Author has selected from the multitude of proven relationships the most important issues and those that may have applicative significance in the future.

Strengths and weaknesses of the Thesis:

Strong points of the submitted work include:

1. a very good series of complementary, well-thought-out and professionally developed three publications,
2. good scientific language and discussion in publications,
3. advanced methods of genetic and bioinformatic analysis requiring extensive knowledge, skills and great diligence,
4. innovative nature of the work and scientific significance of the results obtained,
5. results that can be helpful in application in veterinary and breeding practice.

On the other hand, my comments for further consideration:

1. quite simple, in relation to the research methodology, the method of dividing ejaculates into those with good and bad freezability, based on a simple subjective assessment of sperm motility,
2. no data on the age of boars in one of the papers.

Final conclusions of Thesis evaluation:

The reviewed doctoral dissertation of Anna Katarzyna Mańkowska, MSc, Eng., is carried out by using advanced methodology, the topic of the work is scientifically important, and at the same time presents great applicative potential. The Candidate used a wide range of methods in her research, proving her scientific competence.

I hereby conclude that the doctoral dissertation of Anna Katarzyna Mańkowska, M.Sc., Eng., presented for review is original and valuable achievement fully in the scope of the Discipline and meets the requirements and conditions set out in Article 187 of the Act of 20 July 2018. Law on Higher Education and Science (consolidated text: Journal of Laws of 2022, item 574, as amended). On this basis, I apply to the Scientific Council of the Discipline of Zootechnics and Fisheries of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn to accept Doctoral Thesis of Anna Katarzyna Mańkowska, M.Sc., Eng. and for admission of the Author of the dissertation to next stages of the doctoral proceeding.

In addition, due to the extremely advanced methods used in the work, high-throughput techniques and bioinformatic analysis, innovative character of the experiment, novelity of the results obtained giving significant step forward on the field of reproduction and their applicative potential I consider the work to be outstanding and testifying high competences of the Candidate. Therefore, I request that the work be appropriately awarded by the University of Warmia and Mazury.

Wojciech Niżański

KIEROWNIK
Katedry Rozrodu
z Kliniką Zwierząt Gospodarskich

prof. dr hab. Wojciech Niżański