INSTYTUT ROZRODU ZWIERZĄT I BADAŃ ŻYWNOŚCI PAN
W OLSZTYNIE

ul.Tuwima 10, 10-748 Olsztyn, tel.: (+48 89) 523-46-86; 524-03-13
Fax (+48 89) 524-01-24; e-mail: instytut@pan.olsztyn.pl; www.pan.olsztyn.pl

Olsztyn, 21.01.2023

dr hab. Barbara Wąsowska, prof. Instytutu
Zakład Lokalnych Regulacji Fizjologicznych
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN
ul. Tuwima 10, 10-748 Olsztyn

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 pod kierunkiem Promotora Prof. dr. hab. Leylanda Frasera w Katedrze Biochemii i Biotechnologii Zwierząt, Wydziału Bioinżynierii Zwierząt oraz Drugiego Promotora Prof. dr. hab. Przemysława Sobiecha w Katedrze Chorób Wewnętrznych z Kliniką, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

PODSTAWA PRAWNA I OCENA FORMALNA

Recenzja została przygotowana na wniosek Rady Naukowej Dyscypliny zootechnika i rybactwo, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie (uchwała z dnia 27 października 2022 roku) podjęty zgodnie z wymaganiami 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.), pismo Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny zootechnika i rybactwo Prof. dr. hab. Tomasza Daszkiewicza z dnia 08.11.2022 roku.

Przedstawiona do oceny Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Anny Katarzyny Mańkowskiej „Analiza polimorfizmu DNA oraz ekspresji wybranych genów związanych ze zróżnicowaną przydatnością plemników knura do kriokonserwacji" stanowi zbiór trzech spójnych tematycznie artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych co jest zgodne z art.187 ust.3 ustawy o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity Dz. U. 2022, poz.574 ze zm.) oraz wytycznymi Rady Doskonałości Naukowej (Komunikat 19/2020 z dnia 9 listopada 2020 r.).

Pierwsza (I) publikacja:

Mańkowska A., Brym P., Paukszto Ł., Jastrzębski J.P., Fraser L. Gene polymorphisms in bar spermatozoa and their associations with post-thaw semen quality". *International Journal of Molecular Sciences* 21(5), 1902. DOI: 10.3390/ijms21051902.

Praca opublikowana została w 2020 roku, IF = 5.924; punkty Ministerstwa Edukacji i Nauki (z dnia 21 grudnia 2021 roku) = 140.

Druga (II) publikacja:

Mańkowska A., Brym P., Sobiech P., Fraser L. „Promoter polymorphisms in *STK35* and *IFT27* genes and their associations with boar sperm freezability". *Theriogenology* 189, 199-208. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2022.06.023.

Praca opublikowana została w 2022 roku, IF = 2.923, punkty MEiN = 140.

Trzecia (C) publikacja:
Mańkowska A., Gilun P**.**, Zasiadczyk Ł., Sobiech P., Fraser L. „Expression of *TXNRD1, HSPA4L* and *ATP1B1* genes associated with the freezability of boar sperm". *International Journal of Molecular Sciences* 23(16), 9320. DOI: 10.3390/ijms23169320.
Praca opublikowana została w 2022 roku, IF = 6.208, punkty MEiN = 140.

We wszystkich publikacjach mgr inż. Anna Katarzyna Mańkowska jest pierwszym Autorem. Złożyła oświadczenie potwierdzające indywidualny wkład przy opracowaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników w poszczególnych publikacjach. Współautorzy publikacji złożyli również stosowne Oświadczenia.
Wszystkie czasopisma, w których opublikowano w/w artykuły są anglojęzyczne i znajdują się na liście Journal Citation Report. Łączna wartość współczynnika IF prezentowanych prac wynosi 15.055, a łączna liczba punktów MEiN: 420.

Zbiór publikacji, składających się na Rozprawę doktorską, poprzedza opracowanie w języku angielskim (oraz dodatkowo Streszczenie w języku polskim). Opracowanie liczy łącznie 30 stron i zawiera 45 pozycji piśmiennictwa. Doktorantka przyjęła w opracowaniu następujący układ: Wykaz prac wchodzących w skład Rozprawy doktorskiej, Wykaz skrótów, Streszczenie, Wstęp, Cel pracy, Materiały i Metody doświadczalne, Najważniejsze wyniki badań, Wnioski, Piśmiennictwo oraz publikacje wchodzące w skład Rozprawy jako Załączniki.
Bazę bibliograficzną stanowią w przypadku pierwszej pracy - 92 pozycje, w drugiej - 65, w trzeciej – 66 anglojęzyczne pozycje literaturowe. Cytowane publikacje są ściśle związane z poruszanymi problemami badawczymi, wśród nich zawarte są także artykuły z ostatnich lat (lata: 2021-2022).
Z formalnego punktu widzenia rozprawa spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim.
Na podkreślenie zasługuje uzyskanie zewnętrznego finansowania na realizację badań. Badania (publikacja I i II) wykonano w ramach realizacji projektu Narodowego Centrum Nauki (2015/19/B/NZ9/01333). Mgr inż. Anna Katarzyna Mańkowska była stypendystką programu „Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie w Biogospodarce" (POWR.03.02.00-00-I034/16-00) (Europejski Fundusz Społeczny).

PROBLEM NAUKOWY, ZNACZENIE, CEL BADAŃ, WYNIKI I WNIOSKI

Pomimo licznych badań nad opracowaniem skutecznej metody kriokonserwacji użycie mrożonego nasienia knura w praktyce jest nadal ograniczone i kształtuje się na poziomie poniżej 1% ogólnej liczby wykonywanych zabiegów inseminacyjnych. Wynika to głównie z faktu, iż błona komórkowa plemników knura charakteryzuje się dużą podatnością na uszkodzenia kriogeniczne. Plemniki knura są w dużo większym stopniu wrażliwe na czynniki związane z zamrażaniem niż plemniki innych gatunków zwierząt gospodarskich. Dlatego istnieje ciągła potrzeba doskonalenia technik kriokonserwacji nasienia, a równocześnie poszukuje się markerów, które umożliwią ocenę przydatności nasienia knura do kriokonserwacji. Doktorantka w swojej pracy doktorskiej podjęła się poszukiwania markerów genetycznych do selekcji osobników o korzystnych genotypach w ocenie przydatności nasienia knura do kriokonserwacji.

Celem badań opisanych w rozprawie doktorskiej była analiza polimorfizmu DNA oraz ekspresji wybranych genów związanych ze zróżnicowaną przydatnością plemników knura do kriokonserwacji, dlatego wyznaczono cele szczegółowe, takie jak:
- identyfikacja polimorfizmów pojedynczych nukleotydów tzw. SNP w nasieniu knura przez zastosowanie analizy " variant calling"
- wykorzystanie technologii KASP do genotypowania populacji knurów pod kątem wybranych markerów SNP

- zbadanie związków pomiędzy polimorfizmem SNP w genach a cechami jakościowymi nasienia po zamrożeniu-rozmrożeniu
- analiza związku pomiędzy polimorfizmami DNA w sekwencjach 5'-flankujących genów *STK35* i *IFT27* w nasieniu knurów charakteryzujących się dobrą i słabą przydatnością do kriokonserwacji a miejscami wiązania dla czynników transkrypcyjnych
- analiza mRNA ekspresji genów *TXNRD1, HSPA4L* oraz *ATP1B1* w nasieniu knura świeżym oraz po rozmrożeniu
- określenie ekspresji wybranych białek oraz wskazanie profili elektroforetycznych białek plemnikowych w nasieniu knura świeżym oraz po rozmrożeniu

Wyniki badań przedstawiono w publikacjach, które stanowią rozprawę doktorską.

W artykule I opisano wyniki badań dotyczących danych RNA-Seq uzyskanych podczas porównania profili transkryptomicznych plemników knura o zróżnicowanej przydatności do kriokonserwacji. Po zastosowaniu analizy „variant calling", zidentyfikowano ponad 1000 polimorfizmów pojedynczych nukleotydów tzw. SNP oraz wykazano, że większość z nich znajdowała się w rejonach 3'-niepodlegających translacji (3'-UTR) sekwencjonowanych transkryptów plemnikowych. Do genotypowania populacji knurów wykorzystano metodę KASP. Z wykrytych SNP, czterdzieści wykorzystano w badaniach populacyjno-asocjacyjnych knura rasy wielkiej białej polskiej i analizowano zależności pomiędzy genotypami poszczególnych loci a wybranymi parametrami charakteryzującymi jakość nasienia po rozmrożeniu. Wykazano istotne związki pomiędzy polimorfizmem SNP w genach: *APPL1, PLBD1, FBXO16, EML5, RAB3C, OXSR1, PRICKLE1, MAP3K20* a cechami jakościowymi nasienia po zamrożeniu-rozmrożeniu.

W artykule II analizowano związek pomiędzy polimorfizmem DNA w sekwencjach 5'-flankujących genów *STK35* i *IFT27* funkcjonalnie związanych z odpowiedzią na bodźce stresowe oraz z ruchliwością plemników a zróżnicowaną ekspresją białek STK35 i IFT27 w nasieniu knurów klasyfikowanych do grup o dobrej i słabej przydatności do kriokonserwacji. Zastosowano sekwencjonowanie Sangera i zidentyfikowano obecność tranzycji C>T (rs327863835) w promotorze genu *STK35* oraz dwóch substytucji A>T i T>C (rs337563873; rs331520020) w promotorze genu *IFT27*. Zaobserwowano statystycznie istotne różnice we frekwencjach poszczególnych alleli analizowanych promotorów pomiędzy grupami knurów o dobrej i złej przydatności do kriokonserwacji. Wykonana analiza bioinformatyczna wskazała, że mutacje *STK35* rs 327863835 i *IFT27* rs331520020 mogą powodować powstawanie dodatkowych miejsc wiązania dla czynników transkrypcyjnych takich jak: NFATC2, ELK1 i GR-β, co może powodować różny poziom ekspresji *STK35* i *IFT27* w nasieniu knura o zróżnicowanej przydatności do kriokonserwacji. Badano ekspresję białek STK35 i IFT27 i wykazano różnice pomiędzy nasieniem świeżym i mrożonym oraz wskazano, że ekspresja białka IFT27 była najwyższa w plemnikach knurów grupy o dobrej przydatności do kriokonserwacji.

W artykule III opisano badania wpływu poziomu ekspresji genów związanych ze stresem (*TXNRD1, HSPA4L, ATP1B1*) na kriotolerancję plemników knura. Stwierdzono wyższą ekspresję mRNA genów *TXNRD1* i *HSPA4L* w nasieniu knurów o złej przydatności do kriokonserwacji po rozmrożeniu w porównaniu z nasieniem świeżym. Ekspresja białka HSPA4L była wyższa w nasieniu po rozmrożeniu z grupy o złej przydatności do kriokonserwacji, natomiast ekspresja białka TXNRD1 była wyższa w świeżym nasieniu w grupie o dobrej przydatności do kriokonserwacji. Wykazano także wyższy poziom ekspresji mRNA *ATP1B1* w świeżym nasieniu do dobrej zamrażalności.

Na podstawie przeprowadzonych badań i uzyskanych wyników Doktorantka sformułowała wnioski:

1. Zastosowanie technologii KASP oraz analizy polimorfizmu pojedynczych nukleotydów tzw. SNP potwierdziło, że poszczególne loci genów *APPL1, PLBD1, FBXO16, EML5, RAB3C, OXSR1, PRICKLE1* oraz *MAP3K20* mogą być potencjalnymi markerami genetycznymi jakości nasienia po kriokonserwacji.

2. Polimorfizm w regionach promotorów może różnicować poziom ekspresji *STK35* i *IFT27* w nasieniu knurów charakteryzujących się dobrą i słabą przydatnością do kriokonserwacji co skutkuje powstaniem dodatkowych miejsc wiązania dla czynników transkrypcyjnych. Warianty alleliczne w *STK35* i *IFT27* mogą być uznane za potencjalne markery genetyczne przydatności nasienia knura do kriokonserwacji.
3. Oszacowanie poziomu względnej ekspresji mRNA *ATP1B1* (zastosowanie w badaniach analizy RT-qPCR) w świeżym nasieniu może być wykorzystane do selekcji ejakulatów o dobrej przydatności do zamrażania.
4. Istotne różnice w ekspresji białek STK35, IFT27, TXNRD1, HSPA4L oraz ATP1B1 w nasieniu knurów charakteryzujących się dobrą i słabą przydatnością do kriokonserwacji może potwierdzić potencjalną rolę tych białek w procesach kriotolerancji plemników.

UWAGI OGÓLNE i KOMENTARZ

Dyskusja w publikacjach składających się na przedstawioną do oceny rozprawę doktorską prowadzona jest w sposób logiczny, przejrzysty i zrozumiały z uwzględnieniem licznych cytowań dotyczących omawianego aspektu badań. Stronę metodyczną oceniam jako adekwatnie wybraną do postawionych celów i aktualnie akceptowaną w światowej literaturze co także potwierdzili recenzenci czasopism, w których ukazały się publikacje. W części analitycznej wykorzystano metody oceny jakości nasienia, diagnostykę molekularną DNA i RNA oraz analizę bioinformatyczną. Uzyskano wyniki, które zostały dokładnie zanalizowane i zinterpretowane w oparciu o istniejącą wiedzę i pozwoliły na wyciągnięcie stosownych wniosków. W mojej opinii, pozwala to stwierdzić, że mgr inż. Anna Katarzyna Mańkowska opanowała umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.
Pytania skierowane do Doktorantki oraz prośby o komentarz mają charakter udziału w dyskusji.
Pytania do Doktorantki oraz prośba o komentarz:
1. W publikacji III (strona 11.) Autorzy stwierdzili brak istotnych różnic w ekspresji białek TXNRD1, HSPA41 oraz ATP1B1 w grupach. W jaki sposób można to wytłumaczyć?
2. W jaki sposób mogą być zaangażowane w polimorfizm DNA mitochondria plemników?

WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Anny Katarzyny Mańkowskiej pt.: „Analiza polimorfizmu DNA oraz ekspresji wybranych genów związanych ze zróżnicowaną przydatnością plemników knura do kriokonserwacji" spełnia wymogi 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.)* **i** wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny zootechnika i rybactwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie **o dopuszczenie Pani mgr inż. Anny Katarzyny Mańkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Jednocześnie wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny zootechnika i rybactwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o **wyróżnienie** niniejszej rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.

Uzasadnienie:
Oceniana rozprawa jest dowodem, że Pani mgr Anna Katarzyna Mańkowska opanowała duży zakres wiedzy, posiadła umiejętności w zakresie wykorzystania skomplikowanych technik eksperymentalnych i analitycznych. Uzyskane wyniki mają dużą wartość poznawczą, poszerzają i

uzupełniają dotychczasową wiedzę oraz wskazują na możliwość zastosowania markerów genetycznych w ocenie przydatności nasienia knura do kriokonserwacji.
Wyniki badań opublikowano w czasopismach znajdujących się na liście JCR, dwie z tych publikacji umieszczono w czasopismach z IF powyżej 5. (5.924 oraz 6.208).

Dr hab. nauk wet. Barbara Wąsowska, prof. Instytutu

INSTITUTE OF ANIMAL REPRODUCTION AND FOOD RESEARCH
OF THE POLISH ACADEMY OF SCIENCES

Tuwima 10, 10-748 Olsztyn, Poland; tel.: (+48 89) 523-46-86; 524-03-13
Fax (+48 89) 524-01-24; e-mail: institute@pan.olsztyn.pl; www.pan.olsztyn.pl

January 21, 2023; Olsztyn

dr hab. Barbara Wąsowska, Institute Professor
Department of Local Physiological Regulations
Institute of Animal Reproduction and Food Research
of the Polish Academy of Sciences
Tuwima 10, 10-748 Olsztyn

Review 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”, under supervision of Prof. dr hab. Leyland Fraser and Prof. dr hab. Przemysław Sobiech (Department of Internal Medicine with Clinic, Faculty of Veterinary Medicine). Doctoral thesis conducted at the Department of Animal Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Animal Bioengineering, University of Warmia and Mazury in Olsztyn.

LEGAL BASIS AND FORMAL ASSESSMENT

The review of the doctoral dissertation was prepared at the request of the Chairperson of Scientific Discipline Council ““zootechnics and fishing” of University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Prof. dr hab. Tomasz Daszkiewicz (the letter dated November 08, 2022).The main criteria of evaluation were the requirements specified in the article 187 of the Law on Higher Education and Science of 20 July, 2018 (consolidated text in Journal of Laws 2022, item 574 with amendments).

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” is based on three thematically coherent set of scientific articles published in scientific journals. This form of dissertation is accepted with the article 187 of the Law on Higher Education and Science of 20 July, 2018 (consolidated text in Journal of Laws 2022, item 574 with amendments) and guideline of the Council of Scientific Excellence (Communique 19/2020, dated 9 November 2020), i.e. composed of the published works.

Paper I: 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 (5), 1902. DOI: 10.3390/ijms21051902 (IF = 5.924; pts = 140)

Paper II: 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. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2022.06.023 (IF = 2.923; pts = 140)

Paper III: 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. DOI: 10.3390/ijms23169320 (IF = 6.208; pts = 140)

Mrs Anna Katarzyna Mańkowska is the first author in all articles. She made a statement on her individual contribution to the development of the conception, methodology, formal analysis and results validation. All of the co-authors were also theirs statements included.
All scientific journals in which articles in English were published are included in Journal Citation Report. Summarized IF value of all articles are 15.055 and the amount of points based on the list of scientific journals published by the Ministry of Education and Science (MEiN) is 420.

The articles of the PhD thesis are preceded by development (30 pages and 45 of references) in English (abstract in polish, too). Beside the articles, the dissertation consists of the List of papers, List of Abbreviations, short Summary, Introduction, Aims of study, Materials and Methods, The most of important results, Conclusions, Bibliography. The articles of the PhD thesis are included as attachments.
The set of publications contains: 92 contain the items listed in the first, 65 – in the second and 66 in the third English articles. All of the mentioned articles are closely related to investigated problems in the thesis, among them are most recent articles (published during years: 2021-2022). This dissertation meets the formal requirements.
It is remarkable that the studies (Paper I and Paper II) were supported by a research project from the National Science Centre, Poland (2015/19/B/NZ9/01333). Mrs. Anna Mańkowska is recipient of a scholarship from the program Interdisciplinary Doctoral Studies in Bioeconomy (POWR.03.02.00-00-I034/16-00) financed by European Social Found.

SCIENTIFIC RESEARCH, IMPORTANCE OF RESEARCH, AIM OF STUDY, RESULTS AND CONCLUSIONS

Despite numerous studies, effective cryopreservation method is still inefficient and it is below 1% the whole amount of insemination. This due to the high susceptibility to cryogenic damage of sperm membrane. The boar sperm are more sensitive than other species of farm animals during cryopreservation. There is permanent need to improving sperm cryopreservation methods. At present, there is need to search the markers for detection cryotolerance of boar sperm. Mrs Anna Mańkowska, in her thesis, investigated the molecular markers for selection individuals with high semen freezability.

The aims of study described in PhD thesis were analysis of DNA polymorphisms and of selected genes associates with different freezability of boar spermatozoa. Therefore, the specific aims were to:

- employ variant calling analysis to identify SNPs in genes expressed in boar spermatozoa
- validate selected SNP markers using the KASP genotyping assay
- investigate the associations of gene polymorphisms with the quality characteristics of FT spermatozoa
- 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 transcription factors (TFs)
- analyze *TXNRD1*, *HSPA4L* and *ATP1B1* mRNA expression in the fresh pre-freeze (PF) and frozen-thawed (FT) spermatozoa from boars differing in freezability
- and 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 results of study have been described in articles which are in the dissertation.

In the first study, variant calling of transcriptome sequencing data (RNA-Seq), which allowed the comparison of sperm transcriptome profiles from boars differing in freezability, was performed to identify single nucleotide polymorphisms (SNPs). Variant calling identified more than 1000 SNPs, in which most of them were detected at the 3′-untranslated regions (3′-UTRs). Forty SNPs were used for SNP genotyping by the KASP assay. Analysis showed associations of SNPs with some of the selected parameters of sperm functions following freezing-thawing. Analysis confirmed significant associations of *APPL1, PLBD1, FBXO16, EML5, RAB3C*, *OXSR1*, *PRICKLE1* and *MAP3K20* gene polymorphisms with the quality characteristics of frozen-thawed (FT) spermatozoa.

In the second study, the 5′-flanking region sequences of *STK35,* a stress-related gene, and *IFT27,* a motility-related gene, were PCR amplified and analyzed by Sanger sequencing method to identify polymorphisms in spermatozoa of boars considered as having good and poor semen freezability (GSF and PSF, respectively). Bioinformatics was used to study the interactions of the identified SNPs with transcription factors (TFs) on the gene promoter activity. One SNP, rs327863835 (C > T) was detected in the *STK35* promoter, while two SNPs (rs337563873; A > T; rs331520020, T > C) were detected in the *IFT27* promoter. Significant allele frequency differences of *STK35* and *IFT27* promoter polymorphisms were observed between the freezability groups. It was predicted that *STK35* rs327863835 and *IFT27* rs331520020 resulted in the generation of additional binding sites for TFs, such as NFATC2, ELK1 and GR-β, which might regulate the transcriptional activity of the genes in either freezability group. Furthermore, protein expression of STK35 and IFT27 varied between the fresh and post-thaw (PT) semen, however, IFT27 protein expression was more marked in FT spermatozoa of the good semen freezability (GSF) group.

In the third study, it was investigated whether the expression of stress-related genes (*TXNRD1*, *HSPA4L* or *ATP1B1*) was associated with sperm cryotolerance. Higher relative mRNA expression levels of *TXNRD1* and *HSPA4L* were more marked in FT semen of the PSF group compared with the fresh semen. Likewise, HSPA4L protein expression was markedly higher in FT semen of the poor semen freezability (PSF) group, while the fresh semen exhibited significantly higher expression of TXNRD1 protein in the GSF group. The

significantly higher level of *ATP1B1* mRNA expression in the fresh semen of good freezability ejaculates could be used as a promising marker for semen freezability.

Based on the conducted research and obtained results Mrs Anna Mańkowska formulated the following conclusions:

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.

GENERAL ADVICE AND COMMENTARY

Discussion in each article of dissertation is logical, clear, well understood and based on a rich, up-to-date literature in the field. Methods are adequate for resolve research problems and compatible with global bibliography. There are used laboratory assay for semen evaluation, molecular analysis of DNA or RNA and bioinformatics tools. Obtained results were calculated in detail and interpreted what allows draw conclusions. Considering all this, in my opinion, Mrs Anna Mańkowska has an ability to independently conduct scientific work.

I would like to ask the Candidate to clarify some points regarding the field of this thesis:

1. In the Paper III, Authors stated (page 11) the lack of significant differences between the freezability groups regarding the post-thaw expression levels of TXNRD1, HSPA41 or ATP1B1 protein. What could be the possible explanation for this phenomenon?
2. In which way sperm mitochondria are involved in DNA polymorphism of the studied genes?

FINAL REMARK

The submitted PhD thesis od Mrs Anna Katarzyna Mańkowska: ”Analysis of DNA polymorphisms and expression of selected genes associated with different freezability of boar spermatozoa” meets the requirements specified in Art. 187 of the Act of 20 July, 2018 (Law on Higher Education and Science (Journal of Laws 2022, item 574 as amended) for the candidates applying for the award of doctoral degree. Therefore, **I would like to recommend** to the Scientific Discipline Council “Animal Science and Fisheries” of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn, to admit Mrs Anna Katarzyna Mańkowska to further stages of the doctoral programme.

Additionally, I would like to request to the Scientific Discipline Council “Animal Science and Fisheries” of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn to recognize this dissertation an award.

Justification:

The PhD Candidate has a wide range of knowledge related to the topics and used novel research techniques. The obtained results have a significant research value, and contribute to increase knowledge in the subject matter. These studies indicate that the application of genetic markers for sperm freezability would contribute to the improvement in the cryopreservation of boar semen through the selection of individuals with high freezability ejaculates. The results of the studies were published in JCR journals, in which two of them have an IF above 5.0 (5.924 or 6.208).

Dr hab. Barbara Wąsowska, DVM, PhD, Professor of Institute