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

dr hab. Mariola Słowińska
Tel. (+48 89) 539-31-73
Fax: (+48 89) 524-01-24
e-mail: m.slowinska@pan.olsztyn.pl

Olsztyn, 11.09.2023

RECENZJA
ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR KATARZYNY TERESY RAFALSKIEJ
zatytułowanej „Analiza fosfoproteomów ejakulatów indorów (*Meleagris gallopavo*) o zróżnicowanej jakości biologicznej"

wykonanej w Katedrze Biochemii i Biotechnologii Zwierząt Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie pod kierunkiem promotora dr hab. Pawła Wysockiego, prof. UWM oraz promotora pomocniczego dr inż. Aleksandry Orzołek.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Katarzyny Teresy Rafalskiej pt. **„Analiza fosfoproteomów ejakulatów indorów (*Meleagris gallopavo*) o zróżnicowanej jakości biologicznej"** przygotowana została w postaci monografii naukowej. W pracy zachowany został tradycyjny układ obejmujący spis treści, wykaz skrótów, wstęp i przegląd piśmiennictwa, hipotezę badawczą i cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję i wnioski oraz piśmiennictwo, spis tabel, rycin i streszczenia. Wiodącym tematem rozprawy doktorskiej jest analiza fosfoproteomu nasienia indora w odniesieniu do zróżnicowanej jakości biologicznej ejakulatów. Jako czynniki wpływające na jakość nasienia indora wybrano syndrom żółtego nasienia (ang. Yelow Semen Syndrome, YSS) oraz sezon w którym pozyskano nasienie do badań (wiosenno-letni oraz jesienno-zimowy).

Pogłębienie wiedzy o białkach – ich strukturze, lokalizacji, funkcjach, wzajemnych interakcjach, jak również ich modyfikacjach potranslacyjnych dostarcza coraz szerszych informacji o udziale białek w procesach fizjologicznych jak i patologicznych toczących się w organizmie. Wykazano, iż około 30% białek komórkowych ulega fosforylacji w komórce w czasie jej życia. Fosforylacja ma wpływ na wiele procesów regulacyjnych w komórce, między innymi na metabolizm, podział, przekazywanie sygnałów, homeostazę czy lokalizację białek w komórce. Analiza porównawcza fosfoprotein może dostarczyć ważnych informacji o molekularnych podstawach zarówno procesów fizjologicznych jak i stanów patofizjologicznych organizmu.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Rafalskiej dotycząca porównawczej analizy zmian fosfoproteomu w odniesieniu do YSS doskonale wpisuje się w tematykę związaną z poszukiwaniem molekularnych podstaw zaburzeń tego schorzenia. Ponadto, wiedza o fosfoproteinach w nasieniu ptaków jest znikoma, w związku z tym zagadnienia poruszane przez Doktorantkę w rozprawie są jak najbardziej aktualne i godne uwagi. Wartość prezentowanej pracy podnosi analiza zmian fosfoproteomu w odniesieniu do sezonu, który w przypadku jakości nasienia indora nie jest często poruszanym problem badawczym. Ponadto szczegółowa analiza jakości nasienia indora pozwala na kompleksową charakterystykę zależności pomiędzy poszczególnymi parametrami jakości nasienia a zmianami fosfoprotemu plazmy nasienia i plemników.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska dobrze prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w dyscyplinie Zootechnika i Rybactwo. Ogólna wiedza teoretyczna doktorantki z zakresu biologii rozrodu zwierząt przedstawiona została we Wstępie rozprawy doktorskiej. Wprowadzono czytelnika w zagadnienia związane z budową i funkcjonowaniem układu rozrodczego samców ptaków, wskazując zarówno podobieństwa jak i różnice w fizjologii rozrodu pomiędzy ptakami a ssakami. Scharakteryzowano skład białkowy plazmy nasienia i plemników ptaków, wyróżniając specyfikę nasienia indora. Opisano istniejący stan wiedzy na temat syndromu żółtego nasienia indora oraz wpływu sezonu na chów i hodowlę indorów reprodukcyjnych. W dalszej kolejności Doktorantka wprowadziła pojęcie fosfoproteomiki i wskazała na braki w istniejącej wiedzy z zakresu zmian fosfoproteomu nasienia w odniesieniu do syndromu żółtego nasienia indora oraz sezonu rozrodczego. Przedstawione informacje przekonują o zasadności sformułowanych hipotez badawczych oraz celów pracy doktorskiej oraz potwierdzają wiedzę doktorantki z tematyki zagadnień rozprawy doktorskiej. Zaznaczyć należy, że we Wstępie pracy wskazano na istniejące problemy związane z reprodukcją indyków, a więc szybką utratę zdolności zapładniającej nasienia świeżego i nadal wymagającymi optymalizacji technikami mrożenia nasienia indora. Wiedza teoretyczna została także wykazana w dyskusji uzyskanych wyników. Były one wszechstronne i prawidłowe wskazujące na znajomość bieżących zagadnień z biologii rozrodu kręgowców.

W mojej ocenie, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska wskazuje na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez Doktorantkę.

Wskazują na to:

1) Dobrze zaplanowany układ doświadczalny. Materiał badawczy stanowiło 100 ejakulatów indorów BIG-6, pobranych od ptaków pomiędzy 39-42 tygodniem życia, czyli 9-12 tydzień sezonu reprodukcyjnego. Różnice w stężeniu białka plazmy nasienia wskazują na prawidłową klasyfikację ejakulatów na jasne i żółte. Poprawnie dobrano liczebność ejakulatów w grupach, tak aby w każdej

badanej grupie YSS i grupie ptaków zdrowych znajdowało się po 50 obserwacji. Nie mam także żadnych uwag do utworzonych dwóch grup badawczych odnośnie wpływu sezonu tj. wiosenno-letni oraz jesienno-zimowy. Doktorantka zaplanowała w tym doświadczeniu udział ptaków w tym samym przedziale wiekowym. Tu także w każdej grupie badawczej znajdowało się 50 obserwacji.

2) Różnorodny warsztat badawczy. Na uwagę zasługuje poprawność dobranych analiz i ich różnorodność. Do izolacji fosfoprotein zarówno z plazmy nasienia jak i ekstraktów plemników wykorzystano komercyjnie dostępne złoże PHOS-Select Iron Affinity Gel (Sigma-Aldrich) przeznaczone do izolacji fosfopeptydów. Następnie wyizolowane frakcje białkowe poddano różnym technikom elektroforetycznym, włączając w to jednokierunkową natywną elektroforezę (1D-PAGE), jednokierunkową elektroforezę w warunkach denaturujących (z dodatkiem Tricine - Tricine-PAGE oraz mocznika - Urea-PAGE), jednokierunkową elektroforezę w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) oraz dwukierunkową elektroforezę (2D-PAGE). Ta mnogość technik pozwoliła Doktorancke na doskonałe opanowanie technik elektroforetycznych stosowanych w proteomice. Wyselekcjonowane prążki białkowe po SDS-PAGE poddano identyfikacji przy użyciu spektrometrii mas Nano LC-MS/MS z wykorzystaniem systemu Ultimate 3000 HPLC/UPLC (Thermo Fisher Scientific). Natomiast wyselekcjonowane spoty białkowe po 2D-PAGE poddano identyfikacji przy użyciu spektrometru mas MALDI TOF/TOF (Bruker). Zidentyfikowane fosfoproteiny poddano analizom funkcjonalnym przy użyciu programu ShinyGo oraz STRING. Wyizolowane frakcje fosfoprotein po PHOS-Select Iron Affinity Gel poddano także elektrotransferowi w celu detekcji różnic w stopniu ufosforylowania reszt seryny, treoniny i tyrozyny pomiędzy badanymi grupami. Opisane postępowanie metodyczne uważam za poprawne z wyróżniającym wielotorowym podejściem analizy fosfoprotemu.

Analizy proteomiczne nasienia indora zostały ponadto obudowane szerokim spektrum analiz jakości nasienia. Do oceny ruchliwości plemników zastosowano system analizy komputerowej CASA (Hamilton-Thorne Research). Do oceny odsetka plemników żywych (z nienaruszoną plazmolemmą), odsetka plemników z funkcjonalnymi mitochondriami, zmian apoptotycznych plemników oraz odsetka plemników NO^+ wykorzystano barwniki fluorescencyjne w połączeniu z mikroskopem fluorescencyjnym. Szkoda, że do wspominanych analiz nie udało się wykorzystać cytometrii przepływowej, która znacząco ułatwiła by pracę Doktorantce i wzmocniła wiarygodność uzyskanych wyników. Dokładna i rzetelna ocena jakości nasienia, jako materiału wyjściowego do analiz proteomicznych jest już standardem w publikowaniu wyników w czasopismach naukowych, dlatego znajduję pełne uzasadnienie dla przeprowadzenia tak rozbudowanych szczegółowych analiz.

W pracy wykonano także pomiary aktywności wybranych enzymów antyoksydacyjnych w plazmach nasienia badanych ejakulatów, tj. dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy glutationowej

oraz katalazy. Dodatkowo oznaczono zawartość aldehydu malonowego. Tak szczegółowa analiza systemu antyoksydacyjnego ma zapewne istotne znaczenie w badaniach wpływu sezonu na jakość nasienia. Dokonano także pomiaru aktywności fosfatazy kwaśnej i alkaicznej, co wydaje się być szczególnie uzasadniane, ponieważ jest to grupa enzymów, które hydrolizują wiązania fosfodiestrowe, usuwając z białek reszty fosforanowe. Do zobrazowania całości przemian reszt fosforanowych zabrakło mi pomiaru aktywności kinaz, enzymów przyłączających grupę fosforanową do białek. Zaburzona homeostaza między kinazami a fosfatazami może prowadzić do inicjacji procesów chorobowych.

3) Poprawna interpretacja i dyskusja wyników. W oparciu o logicznie zdefiniowane cele uzyskano wyniki, które dostarczyły nowych informacji o fosfoproteomie nasienia indora. W szczegółach opisano analizę porównawczą fosfoprotein plazmy nasienia YSS w porównaniu do plazmy nasienia jasnego oraz plazmy nasienia pozyskanej w sezonie wiosenno-letnim w porównaniu do sezonu jesienno-zimowego. Do wspominanych analiz wykorzystano profile uzyskane metodami Native-PAGE, Tricine-PAGE, Urea-PAGE, SDS-PAGE oraz 2D-PAGE. Wyniki udokumentowano stosownymi rycinami i tabelami. Wyniki prezentujące identyfikację białek technikami spektrometrii mas Nano LC-MS/MS oraz MALDI TOF/TOF zaprezentowano w tabelach informując o liczbie zgodnych peptydów, pokryciu sekwencji oraz wartości „score" dla poszczególnych białek. W analogiczny sposób przedstawiono wyniki analiz fosfoproteomu plemników. Ostatnim elementem analiz fosfoprotein nasienia indora była immunodetekcja poziomu ufosforylowania reszt seryny, treoniny i tyrozyny w odniesieniu do YSS i sezonu. Analizy przeprowadzono zarówno w plazmie nasienia jak i ekstraktach plemników, a wyniki udokumentowano za pomocą stosowanych rycin i tabel. Na uwagę zasługuje ciekawe zestawienie wszystkich zidentyfikowanych białek w postaci tabel 4.99 i 4.100. Wskazano w nich potencjalne miejsca fosforylacji dla zidentyfikowanych fosfoprotein, wiązane przez nie związki, lokalizację komórkową oraz funkcje białek. Doceniam ogrom pracy i czasu włożony w przygotowanie tak szczegółowych zestawień wyników. Jednakże, z mojego punktu widzenia najciekawsze wyniki rozprawy doktorskiej to analiza funkcjonalna zidentyfikowanych fosfoprotein, która daje nam pogląd na temat molekularnych zmian czy zaburzeń procesów fizjologicznych w nasieniu. Doktorantka wykazała, iż zidentyfikowane fosfoproteiny biorą udział w interakcji i wiązaniu się plemnika z komórką jajową, w procesie zapłodnienia oocytu, organizacji cytoszkieletu, metabolizmie plemników, transporcie wewnątrzkomórkowym oraz ustalaniu składów proteomów poszczególnych przedziałów komórkowych. Takie same analizy funkcjonalne chciałbym zobaczyć dla różnicujących fosfoprotein nasienie YSS oraz zmian sezonowych. Te z kolei przedstawiono w postaci diagramu obrazującego poszczególne geny, niestety bez analiz

funkcjonalnych (Ryciny 4.73-4.76). Podsumowując wykazano, iż rodzaj uzyskanego nasienia jak i sezon mogą wpływać na fosfoproteom nasienia indora.

Dodam tylko, iż znaczną część sekcji wyniki stanowi szczegółowa charakterystyka jakości nasienia w odniesieniu do schorzenia YSS i sezonu, której rolą według mnie powinno być przede wszystkim szczegółowe opisanie jakości nasienia, jako materiału wyjściowego użytego do analiz fosfoproteomu, które są głównym celem tej rozprawy doktorskiej.

Doktorantka dyskutuje uzyskane wyniki bazując na dostępnej wiedzy z zakresu rozrodu ptaków i ssaków. Moim zdaniem dyskusja jest wszechstronna i prawidłowa. Chociaż podczas przygotowywania materiału do publikacji radziłabym przeprowadzić dyskusję bazując głównie na pracach odnoszących się do ptaków. Argumentuję to specyfiką rozrodu ptaków o której Doktorantka wspominała już na wstępie rozprawy doktorskiej oraz wymaganiami specjalistycznych czasopism, np. *Poultry Science*.

Moim zdaniem przedstawiona do oceny rozprawa doktorska umożliwiła Doktorantce wszechstronne, praktyczne opanowanie metod i technik pracy badawczej oraz **rozwiązanie postawionego sobie oryginalnego problemu naukowego.** Doktorantka prawidłowo sformułowała problem badawczy, co wymagało znacznej wiedzy o tematyce związanej z rozrodem ptaków oraz proteomiką, a dokładnie jej poddziedziną - fosfoproteomiką. Doktorantka jednoznacznie wykazała zależność pomiędzy fosfoproteomem a jakością nasienia u indora, co jest najważniejszym osiągnięciem rozprawy doktorskiej.

Podczas szczegółowej analizy pracy nasunęły mi się uwagi i pytania. Najistotniejsze z nich przestawiam poniżej z prośbą o wyjaśnienie lub komentarz.

1. Różnice w stężeniu białka plazmy nasienia wskazują na prawidłową klasyfikację ejakulatów na jasne i żółte, chociaż stężenie białka w ejakulatach żółtych odbiega od publikowanych wcześniej wartości dla syndromu żółtego nasienia (>20 mg/ml; Thurston et al., 1982. Elevated seminal plasma protein: A characteristic of yellow turkey semen. Poult. Sci. 61:1905–1911. doi:10.3382/ps.0611905.). Proszę o komentarz.
2. W pracach opisujących wpływ sezonu na parametry jakości nasienia autorzy często padają warunki pogodowe panujące podczas doświadczenia. Czy doktorantka opracowała takie dane dla grup badawczych reprezentujących wpływ sezonu na jakość nasienia?

3. Jakimi kryteriami kierowała się Doktorantka przy wyborze złoża do wzbogacania fosfoprotein. W dostępnej literaturze nie znalazłam zastosowania złoża PHOS-Select Iron Affinity Gel (Sigma-Aldrich) do izolacji fosfoprotein z materiału biologicznego. Ponadto dostępna literatura wskazuje na wysoki poziom niespecyficznych wiązań podczas stosowania chromatografii z matrycą z imobilizowanymi jonami metali. Czy testowano specyficzność zastosowanego złoża?

4. Trochę martwi mnie niska jakość żeli po 2D-PAGE. W czym Pani zdaniem może tkwić problem techniczny analizy?

5. Jakie kryteria przyjęto podczas wyznaczenia różnicujących prążków i spotów fosfopeptydów? Dokładnie chodzi o wartość prawdopodobieństwa i stosunek intensywności prążków i spotów.

6. Proszę o komentarz dlaczego wyniki identyfikacji białek po SDS-PAGE przy użyciu Nano LC-MS-MS przedstawiono w dużej większości w odniesieniu do bazy danych koguta (*Gallus gallus*, Tabele 4.75 oraz 4.91), a wyniki uzyskane po 2D-PAGE przy użyciu MALDI używając bazy danych indora (*Meleagrs gallopavo*, Tabele 4.78 oraz 4.94).

7. Chciałabym zasugerować, aby podczas przygotowania publikacji, surowe dane po analizie spektrometrem mas umieścić w repozytorium. Jest to już szeroko stosowana praktyka, wręcz wymagana przez recenzentów publikacji naukowych. To samo dotyczy wszystkich skanów żeli oraz blotów zastosowanych do analiz.

8. W pracy brak jest walidacji uzyskanych wyników proteomicznych. Dlatego bardzo proszę Doktorantkę o zaproponowanie możliwych wariantów walidacji uzyskanych wyników z analizy fosfoproteomu.

WNIOSEK KOŃCOWY

Pozytywnie oceniam przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską. Ponadto stwierdzam, iż przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Katarzyny Teresy Rafalskiej odpowiada warunkom określonym w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023r poz. 742 ze zm.). W związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie Pani mgr inż. Katarzyny Teresy Rafalskiej do dalszych etapów postepowania.

Z poważaniem

Mariola Słowińska

Mariola Słowińska