dr hab. Anna Korzekwa, prof. Instytutu
Zakład Ochrony Bioróżnorodności
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

Popielno, 20 sierpnia 2020 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Alicji Dyrdy
pt. „Analiza fosfoproteomu najądrzowego nasienia ogiera"

wykonana zgodnie z uchwałą Rady Naukowej Dyscypliny zootechnika i rybactwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z dnia 10 lipca 2020 r.

Formalna ocena pracy

Praca została wykonana pod kierunkiem dra hab. Pawła Wysockiego, prof. UWM oraz promotora pomocniczego, dr inż. Aleksadry Orzołek w Katedrze Biochemii i Biotechnologii Zwierząt, Wydziału Bioinżynierii Zwierząt, UWM.

Złożoność procesu zapłodnienia, mnogość czynników, które mają na niego wpływ, jak i warunki w jakich zachodzi powodują, że pozostaje on zjawiskiem nie w pełni zbadanym i zrozumianym zarówno u człowieka, jak i w świecie zwierząt, tym bardziej, że zapłodnienie jest procesem precyzyjnie regulowanym i swoistym gatunkowo. Proteomika znajduje coraz większe zastosowanie w wyjaśnianiu zjawisk towarzyszących procesom reprodukcyjnym i jest pomocna w biotechnikach rozrodu, w tym u koni. Podjęte w pracy doktorskiej badania dotyczące identyfikacji białek występujących w najądrzach i plemnikach ogiera pozwolą na określenie zmian jakim podlegają plemniki w procesie dojrzewania w zależności od sezonu reprodukcyjnego. Ponadto wyodrębnione proteiny wskażą na procesy biologiczne jakie zachodzą w poszczególnych kompartymentach najądrzy, co może być pomocne w przyszłości w konstruowaniu uniwersalnych buforów używanych do konserwacji nasienia, jak i testów do diagnozowania płodności samca lub przydatności jego nasienia do konserwacji.

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Katarzyny Dyrdy jest formą monografii w postaci 97 stron. Układ dysertacji zawiera rozdziały: Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wstęp, Przegląd piśmiennictwa, Cel, Materiał i Metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski i Literatura.

Rozdział Wstęp składa się z dwóch stron i stanowi wprowadzenie w tematykę sezonowości rozrodu u koni oraz potrzeb hodowlanych idących w kierunku biotechnik rozrodu u tego gatunku. W kolejnym, 20-stronnicowym rozdziale: Przegląd piśmiennictwa opisano budowę i funkcje najądrzy, znaczenie płynu najądrzowego w dojrzewaniu plemników, znaczenie proteomiki w badaniach funkcji rozrodczych samców zwierząt domowych,

fosfoproteomikę płynu najądrzowego ssaków, proteomikę nasienia ogiera, wpływ sezonowości na jakość nasienia ogiera, kriokonserwację nasienia najądrzowego ogiera, wykorzystanie kriokonserwowanego nasienia najądrzowego w inseminacji klaczy. Rozdział zakończony jest sformułowaniem następującej hipotezy badawczej: *„W kolejnych odcinkach najądrzy ogiera zachodzą uwarunkowane sezonowo procesy fosforylacji/defosforylacji białek towarzyszące dojrzewaniu plemników"*.

Zdaniem Doktorantki, w dostępnym piśmiennictwie brak jest informacji dotyczących zmian fosforylacji białek nasienia najądrzowego ogiera w zależności od odcinka najądrzy i sezonu reprodukcyjnego, zatem celem pracy doktorskiej była charakterystyka fosfoproteomu zarówno w plemnikach, jak i w płynach najądrzowych u ogiera.

Siedmiostronicowy rozdział Materiał i Metody zawiera opis materiału badawczego, jego pozyskania, wszystkich metod analitycznych oraz statystycznych.

Następnie Doktorantka przedstawiła Wyniki i opisała je kierując się kolejno oznaczeniem zawartości białka całkowitego, elektroforezą jednokierunkową, immunodetekcją fosfoprotein w płynach najądrzowych i w plemnikach oraz ich identyfikacją.

Dyskusja zaprezentowana jest na 16 stronach i po czterostronicowym ogólnym podjęciu polemiki, następuje dyskusja otrzymanych wyników z literaturą na temat identyfikacji fosfoprotein płynu najądrzowego i ekstraktu plemnikowego. Rozdział kończy się Podsumowaniem.

W dysertacji sformułowano następujące wnioski:

1. Intensywność procesów fosforylacji/defosforylacji białek płynu najądrzowego oraz plemników jest różna w poszczególnych segmentach najądrzy.
2. W płynie najądrzowym nasilenie procesu fosforylacji białek stwierdzano poza sezonem rozrodczym, podczas gdy w ekstraktach plemnikowych w trakcie jego trwania.
3. Fosfoproteom plemników najądrzowych ogiera zawiera różne grupy białek, w tym białka regulacyjne, transportowe, opiekuńcze, antyoksydacyjne, ubikwitynacyjne oraz związane z ruchliwością i apoptozą komórek. Odwracalnej fosforylacji może podlegać wiele enzymów.
4. Szereg białek płynu najądrzy pełniących funkcje antyoksydacyjne podlega regulacji z wykorzystaniem fosforylacji reszt seryny, treoniny i tyrozyny. Należą do nich serotransferyna, S-transferaza glutationowa, ceruloplazmina, peroksyredoksyna 1 i 2 oraz białka HSP 70 i HSP β1.

5. W ekstraktach plemnikowych zidentyfikowano białka związane z ochroną antyoksydacyjną podlegające zróżnicowanej fosforylacji. Są to białka z rodziny HSP, izomeraza wiązań disiarczkowych A3 i A6 oraz peroksyredoksyna 5.
6. Wiele składników systemu ubikwitynacji białek w nasieniu najądrzowym ogiera (enzym aktywujący ubikwitynę, tioesteraza ubikwityny, hydrolaza C-końca ubikwityny, białka z rodziny HSP, receptory sprzężone z białkiem G) podlega regulacji na szlaku fosforylacji / defosforylacji. Jest to prawdopodobnie związane z intensywnymi procesami degradacji białek w kolejnych odcinkach najądrzy.

Literatura jest w większości anglojęzyczna i składa się z 174 pozycji literatury anglojęzycznej, ułożonej alfabetycznie.

Ocena rozprawy doktorskiej

Praca doktorska Pani mgr inż. Katarzyny Alicji Dyrdy wnosi nową wiedzę na temat analizy fosfoproteomu najądrzowego nasienia ogiera, jest bardzo wartościowa nie tylko pod względem poznawczym, ale posiada wysoki potencjał do wykorzystania w praktyce – inseminacji i unasienniania oraz zapłodnienia *in vitro*, gdzie wykorzystuje się nasienie pozyskane z najądrzy. Doktorantka zdołała uzyskać relatywnie dużą liczbę wyników, co zapewne przełoży się na ich wartościową publikację.

Pytania, prośby o komentarz oraz uwagi

1. W dysertacji nie umieszczono Wykazu skrótów, a badania dotyczą wielu białek, których nazwy skrótowe są powszechnie używane, zatem taki wykaz poprawiłby czytelność pracy doktorskiej.
2. Hipoteza badawcza jest zbyt ogólnikowa, powinna zostać rozbudowana o oczekiwany wpływ sezonowości rozrodczej i wskazanie funkcji zidentyfikowanych fosfoprotein w rozbiciu na plemniki i płyny najądrzowe.
3. We Wstępie Doktorantka opisuje dostępną wiedzę literaturową dotyczącą wykorzystania kriokonserwowanego nasienia najądrzowego w inseminacji klaczy i za Haardem i Haardem (1991) wskazuje, że „*ze względu na obniżoną żywotność plemników (...) inseminację należy wykonać bezpośrednio przed lub po owulacji*". Skoro proces owulacji trwa średnio u klaczy 24 godziny, to inseminacja bezpośrednio po owulacji nie ma szansy powodzenia na zapłodnienie. Czy nie wkradł się przypadkiem błąd w tłumaczeniu lub interpretacji tej publikacji.

4. Opis wyników Doktorantka zaprezentowała zgodnie z kolejnością użytych metod analitycznych. W pierwszej kolejności opisano wyniki dotyczące pomiaru zawartości białka, następnie elektroforezy jednokierunkowej, immunodetekcji i identyfikacji białek w płynach najądrzowych i ekstraktach plemnikowych. Wg mnie sformułowanie zadań badawczych dotyczących wyodrębnienia i identyfikacji protein w płynach najądrzowych i oddzielnie w plemnikach byłoby lepszą konstrukcją ponieważ nakierowałoby Doktorantkę i czytelnika na Dyskusję w sposób porównawczy. Poza tym sposób porównawczy byłby łatwiejszy w celu przygotowania konkretnych publikacji otrzymanych w niniejszej rozprawie wyników w czasopismach.
5. W pracy doktorskiej udało się wyodrębnić i zidentyfikować wiele białek, co wpływa na jej wysoki poziom naukowy. Jednak dla jasności i przejrzystości wyników, powinno zostać wykonane tabelaryczne ich zestawienie, oddzielnie w płynach najądrzowych i w plemnikach z zaznaczeniem, np. strzałkami najważniejszych zdaniem Doktorantki fluktuacji w zależności od sezonu reprodukcyjnego lub tych protein, których funkcja jest już poznana.
6. Doktorantka w rozprawie doktorskiej kilkukrotnie wskazuje na działanie prostaglandyn w płynie najądrzowym, opisując występowanie syntaz tych eikozanoidów. Czy Doktorantka mogłaby wskazać o jakie konkretnie prostaglandyny chodzi i jaka może być ich funkcja w gonadach u samca. Czy w ramach badań własnych udało się u ogiera zidentyfikować również jakiekolwiek prostaglandyny w płynie najądrzowym czy plemnikach i czy są dane literaturowe na temat ich identyfikacji i roli w gonadach ogiera?
7. Rozdział Dyskusja rozpoczyna ogólny opis na temat procesu fosforylacji białek i proteomiki, w postaci dwóch pierwszych akapitów, który wg mnie jest zbędny, nie odnosi się bezpośrednio do otrzymanych wyników i niepotrzebnie przypomina czytelnikowi elementarną wiedzę biologiczną, tym bardziej, że we Wstępie również opisano te zagadnienia.
8. Wniosek nr 3: „*Fosfoproteom plemników najądrzowych ogiera zawiera różne grupy białek, w tym białka regulacyjne, transportowe, opiekuńcze, antyoksydacyjne, ubikwitynacyjne oraz związane z ruchliwością i apoptozą komórek. Odwracalnej fosforylacji może podlegać wiele enzymów*", jest sformułowany na podstawie dostępnej wiedzy literaturowej, a nie wynika bezpośrednio z wyników w ramach realizacji badań. Należałoby usunąć ten wniosek.
9. Czy zamierza Pani kontynuować zagadnienie dotyczące proteomu gonad ogiera w przyszłej pracy naukowej i w jakim kierunku będą postępować te badania?

10. W dysertacji dostrzegłam drobne błędy: str. 8 – sąsiaduje, a nie siąsiaduje, str. 19 – scharakteryzowaną, a nie scharakteryzowana, str. 37 – brak spacji pomiędzy 2,97 a mg/ml, str. 75 – rolę, a nie rola.

Posumowanie i wniosek końcowy

Przedstawione w niniejszej recenzji uwagi i komentarze stanowią element naukowego dyskursu i nie umniejszają wartości merytorycznej dysertacji. Praca napisana jest bardzo starannie, zawiera bardzo dużo wyników z szansą na ich publikację w dobrych indeksowanych czasopismach. Doktorantka znakomicie wykorzystała dostępne, nowoczesne metody badawcze do realizacji zamierzonych celów pracy. Uzyskane rezultaty są nowatorskie i ważne nie tylko z punktu widzenia naukowego, ale z potencjałem do wykorzystania w biotechnikach rozrodu.

W mojej opinii, rozprawa doktorska mgr inż. Katarzyny Alicji Dyrdy stanowi przemyślane oraz interesujące, rozwiązanie problemu naukowego w odniesieniu do celów badawczych, metodyki, opracowania wyników i sformułowania wniosków, a prezentacja redakcyjna wyników przeprowadzonych badań jest również dowodem wysokich umiejętności Autorki do prowadzenia pracy naukowej. W związku z tym bez wątpienia stwierdzić należy, że przedstawiona do oceny dysertacja doktorska pt. *„Analiza fosfoproteomu najądrzowego nasienia ogiera"* odpowiada warunkom określonym w art. 13 ust. I ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz. 595 ze zm. Dz.U. z 2005 r., Nr 164, poz. 1365) stawiane pracom doktorskim.

Przedkładam zatem Wysokiej Radzie Naukowej Dyscypliny zootechnika i rybactwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie wniosek o przyjęcie pracy i dopuszczenie mgr inż. Katarzyny Alicji Dyrdy do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim. Wnioskuję również o wyróżnienie pracy doktorskiej stosowną nagrodą ze względu na wysoki potencjał wdrożeniowy i jakość otrzymanych wyników gotowych do publikacji.

KIEROWNIK ZAKŁADU
BIOLOGII I OCHRONY BIOLOGICZNEJ RÓŻNORODNOŚCI

dr hab. inż. Anna Korzekwa, prof. nadzw.
IRZiBŻ PAN w Olsztynie