

Poznań, 28 listopada 2023

Prof. dr hab. Piotr Kozłowski

**RECENZJA**  
**rozprawy doktorskiej Michała Antkowiaka**

***Geny otyłości: analiza wariantów strukturalnych w genomie psa domowego  
(Canis lupus familiaris)***

Praca doktorska została wykonana w Katedrze Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu, pod kierunkiem prof. dr hab. Macieja Szydlowskiego (promotor).

Rozprawa została przygotowana na podstawie trzech artykułów eksperymentalnych (wymienionych poniżej) opublikowanych w uznanych czasopismach naukowych o ugruntowanej rozpoznawalności w dziedzinie genetyki zwierząt i genetyki ogólnej. Wszystkie czasopisma notowane są w bazie Web of Science (core collection) i wydawane są w języku angielskim, co zapewnia im rozpoznawalność międzynarodową, chociaż *Folia Biologica (Kraków)* wydawane jest lokalnie przez Instytut Systematyki i Ewolucji Zwierząt PAN. Aktualne współczynniki oddziaływania (impact factor) tych czasopism wynoszą odpowiednio: 3.2 (*Animal Genetics*), 0.4 (*Folia Biologica*) i 3.7 (*Frontiers in Genetics*).

1. **Antkowiak M**, Szczerbal I, Nowacka-Woszek J, Switonski M, Szydlowski M. No association between AMY2B gene copy number and obesity risk in Labrador retriever dogs. *Anim Genet.* 2019 Oct;50(5):552-553.
2. **Antkowiak M**, Nowacka-Woszek J, Szczerbal I, Switonski M, Szydlowski M. AMY2B gene copy-number variation studied by droplet digital PCR (ddPCR) in three canids: red fox, arctic fox, and Chinese raccoon dog. *Folia Biol. (Krakow)* 2020 68:51-55.
3. **Antkowiak M**, Szydlowski M. Uncovering structural variants associated with body weight and obesity risk in labrador retrievers: a genome-wide study. *Front Genet.* 2023 Sep 20;14:1235821.

We wszystkich artykułach mgr Antkowiak jest pierwszym autorem, natomiast promotor (prof. Szydlowski) jest autorem korespondencyjnym na ostatniej pozycji (ang. senior autor). Prace są ogólnie nielicznoautorskie, co ułatwia ocenę i podkreśla znaczącą rolę pierwszego autora. Udział doktoranta w powstaniu niniejszych prac przedstawiony został również w załączonych listach współautorów, z których wynika, że mgr Antkowiak wykonał ogromną większość prac eksperymentalnych oraz analizę i interpretację wyników opisanych w artykułach wchodzących w skład rozprawy. Co warto podkreślić mgr Antkowiak brał również znaczący udział w przygotowaniu manuskryptów, przygotowaniu rycin i figur, jak

również brał udział w rewizji manuskryptów w trakcie recenzji. Natomiast za opiekę merytoryczną, koordynację badań oraz za koncepcję pracy i finansowanie odpowiadał głównie prof. Szydłowski (promotor). Przedstawiony powyżej podział prac, odzwierciedlony również w kolejności autorów w artykułach, reprezentuje wzorowy podział pracy pomiędzy doktoranta i promotora i wskazuje wiodący udział mgr Antkowiaka w zakresie prac przewidzianych dla doktoranta.

Poza wymienionymi artykułami, w skład rozprawy wchodzi streszczenia w języku polskim i angielskim, cel pracy, inne techniczne elementy oraz skrótowy opis całej pracy. Jak dla mnie „skrótowy opis” jest niepotrzebnie za długi, powtarza on w znacznym stopniu informacje zawarte w artykułach i wprowadza przez to niejasność – którą właściwie część jest podstawą oceny?

Podstawowym przedmiotem/celem niniejszej rozprawy było poszukiwanie związku między zmiennością wariantów liczby kopii w genomie psa a masą ciała (otyłością) psów, realizowanym głównie na przykładzie rasy labrador retriever.

W pierwszej pracy (Antkowiak M, *Anim Genet.* 2019), która ma charakter krótkiego (jednostronicowego) raportu, wykazano, że średnia liczba kopii genu amylazy trzustkowej *AMY2B* u psów rasy labrador retriever wynosi ~13 (przedział 9-18) jednak nie wykazuje związku (asocjacji) z masą ciała i otyłością psów. Analiza została wykonana na znacznej grupie 109 psów, sklasyfikowanej według Wskaźnika Kondycji Ciała (BCS), przy użyciu opracowanego przez doktoranta testu wykorzystującego reakcję emulsyjnego PCR (ddPCR, ang. *droplet digital PCR*).

W drugiej pracy (Antkowiak M, *Folia Biol.* 2020) również z wykorzystaniem opracowanego testu ddPCR porównano i scharakteryzowano liczbę kopii genu *AMY2B* w reprezentatywnych grupach osobników, 3 gatunków spokrewnionych z psem, lisa rudego (srebrzystego; n = 60), lisa polarnego (n = 53) i jenota azjatyckiego (n = 39). W wyniku przeprowadzonej analizy wykazano, relatywnie niski poziom i małą zmienność liczby kopii w badanych gatunkach. Większość osobników wykazywała 2 kopie genu i tylko, odpowiednio, 8%, 32% i 8% osobników posiadało 3 kopie. Ciekawy jestem czy obserwowane rozkłady genotypów, szczególnie u lisa polarnego są zgodne z rozkładem Hardy'ego-Weinberga. Nie zauważyłem informacji o tym w artykule. To samo dotyczy innych, szczególnie dwuallelicznych wariantów, analizowanych w następnej pracy.

Pierwszym etapem trzeciej pracy (Antkowiak M, *Front Genet.* 2023) była identyfikacja wariantów strukturalnych na podstawie wygenerowanych wcześniej (Szydłowski, Antkowiak, *J Appl Genet.* 2022) danych sekwencjonowania całego genomu (WGS, ang. *whole genome sequencing*) 50 psów rasy labrador retriever. Na podstawie przeprowadzonej analizy zidentyfikowano szereg wariantów wykazujących związek z masą ciała, z których do drugiego etapu analizy, tj. analizy asocjacji w pełnej grupie 109 psów wyselekcjonowano 7 wariantów (*ALPL*, *KCTD8*, *RYR3*, *SGM1*, *SLC12A6*, *VPS26C* i *MME*). Warianty do drugiego etapu zostały wybrane na podstawie wyników asocjacji z pierwszego etapu analizy oraz położenia wariantów (bliskości) względów genów kodujących białka. Genotypowanie wybranych wariantów ponownie zostało wykonane z zastosowaniem opracowanych przez doktoranta testów ddPCR. W jednym przypadku wariant zlokalizowany w genie *MME* okazał się wariantem monoallelicznym, co wskazuje na brak zmienności liczby kopii w tym regionie, przynajmniej w badanej grupie psów. Analiza statystyczna wyników genotypowania pozostałych wariantów wykazała związek wszystkich wariantów z otyłością i masą ciała, przy

czym ten ostatni w przypadku dwóch wariantów (*KCTD8* i *VPS26C*), był poniżej formalnej granicy istotności. [Jako że wykorzystane w tej pracy dane WGS, wygenerowane zostały we wcześniejszej współautorskiej publikacji doktoranta i promotora, wydawałoby mi się sensowne włączenie również tej wcześniejszej pracy do rozprawy.]

Ocena:

Rozprawę przeczytałem z przyjemnością i dużym zainteresowaniem, wpisuje się ona dobrze w zakres moich kompetencji. Włączone do rozprawy publikacje, stanowią spójny tematycznie i uzupełniający się wzajemnie zbiór. Cel rozprawy, jak i każdej pracy z osobna jest poprawny i dobrze uzasadniony. Metody eksperymentalne i dane zostały prawidłowo dobrane. Wyniki zostały przeanalizowane z użyciem odpowiednich testów statystycznych z uwzględnieniem czynników, które potencjalnie mogłyby zakłócać analizę/wyniki. Wnioski zostały wyciągnięte i zinterpretowane prawidłowo. Nie dopatrzyłem się żadnej nadinterpretacji. Jedyną wątpliwość budzi we mnie wykorzystanie (w 3 publikacji) częściowo tych samych psów do identyfikacji/wyboru wariantów, a następnie wykorzystanie ich w drugim (walidacyjnym) etapie analizy.

Drobne uwagi:

Nie wiem, czy dobrze rozumiem dane zaprezentowane w Tabeli 6, w kolumnie mediana. Jako że liczby kopii są wartościami dyskretnymi, spodziewałbym się w tej kolumnie liczb całkowitych.

Jakość wydruków załączonych prac jest słaba a w przypadku pracy 3 wręcz fatalna, na pograniczu czytelności. Nie wiem, z czego to może wynikać.

Pytania na obronę:

Wielkość zidentyfikowanych (w publikacji #3) wariantów strukturalnych jest relatywnie mała. Przykładowo większość wariantów wybranych do genotypowania mieści się w obrębie genów, a żaden nie obejmuje całego genu czy kilku genów. Czy może to wynikać z algorytmów użytych do identyfikacji wariantów strukturalnych? Czy użycie innych metod/algorytmów mogłoby pozwolić na wykrycie większych wariantów? Z czego wynikało zastosowanie w pracy takich, a nie innych metod?

W dyskusji odnośnie do zidentyfikowanych wariantów doktorant często stwierdzał, że dalsze badania nad tym wariantem są uzasadnione. Np. strona 39 „... dalsze badania nad niniejszym genem w kontekście otyłości psa domowego wydają się uzasadnione”. Jakie dalsze badania doktorant miał na myśli lub jakie dalsze badania doktorant by sugerował?

W dyskusji na stronie 38, w 3 akapicie znajdują się stwierdzenia, które sugerują, że w badanych gatunkach znajdują się również inne homologi genu *AMY*, jak np. u niedźwiedzi. Dlaczego zatem w pracy skupiono się na genie *AMY2B*, a nie na innych genach z tej rodziny? Czy inne homnologi genu *AMY* występują również u psa?

Podsumowanie:

W związku z powyżej przytoczonymi argumentami jestem przekonany, że przedłożona rozprawa doktorska mgr Michała Antkowiaka spełnia wszystkie warunki rozprawy doktorskiej, w tym określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668). W związku z powyższym zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny *Nauki Biologiczne* Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie mgr Michała Antkowiaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, jako że rozprawa stanowi znaczący i nowatorski wkład w zagadnienie genetyki otyłości u psów oraz w zagadnienie strukturalnej zmienności psiego genomu, oraz jako że wszystkie elementy rozprawy zostały opublikowane w rozpoznawalnych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, a mgr Antkowiak miał znaczący wkład w powstanie tych publikacji, wnioskuję o wyróżnienie pracy/rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.



Piotr Kozłowski