



**Ocena rozprawy doktorskiej
mgr inż. Pauliny Krzemińskiej
pt. Polimorfizm i ekspresja wybranych genów kandydujących psów
z zaburzeniami rozwoju płci**

Rozprawa doktorska mgr Pauliny Krzemińskiej powstała w oparciu o cykl pięciu publikacji: trzy oryginalne prace badawcze i dwa dalsze artykuły („short communication” i „brief report”). Wszystkie prace zostały opublikowane w czasopismach indeksowanych w bazie JCR. Można zatem stwierdzić, że wyniki badań i ich pełna dokumentacja, zostały zrecenzowane przez minimum dwóch zagranicznych ekspertów powołanych przez redakcję czasopism. W związku z tym moja ocena będzie w dużym stopniu dotyczyć polskojęzycznego opracowania. Tytuł rozprawy jest bardzo dobrze sformułowany, brzmi zwięźle i jasno. Doktorantka w opracowaniu zamieściła wstęp, opis metod badawczych i dyskusję mające na celu zwięźlenie pracy w całość, natomiast wyniki omówiła dla każdego z artykułów, krótko przedstawiła dane niepublikowane i dołączyła skany pięciu publikacji. Co ważne, w autorskim omówieniu Doktorantka przedstawia hipotezę badawczą, cel badań, wnioski oraz streszczenia w języku polskim i angielskim, a także dwujęzyczny wykaz używanych w pracy skrótów. Moją uwagę zwróciło profesjonalne przedstawienie wkładu Doktorantki w rozdziale *Wyniki*, które uzasadnia pierwsze autorstwo i wskazuje wiodący udział w realizacji badań. Ponadto, zgodnie z wymogami, stosowne oświadczenia współautorów zostały załączone w końcowej części opracowania. Dane bibliograficzne cyklu artykułów zestawiam poniżej:

1. **Krzeminska P**, D'Anza E, Ciotola F, Paciello O, Restucci B, Peretti V, Albarella S, Switonski M. Polymorphisms of *MAMLD1*, *SRD5A2*, and *AR* candidate genes in seven dogs (78,XY; *SRY*-positive) affected by hypospadias or cryptorchidism. *Sexual Development* 2019, 13: 92-98. **(IF = 2,028; MNiSW = 100)**
2. **Krzeminska P**, Nizanski W, Nowacka-Woszek J, Switonski M. Analysis of testosterone pathway genes in dogs (78,XY; *SRY*-positive) with ambiguous external genitalia revealed a homozygous animal for 2-bp deletion causing premature stop codon in *HSD17B3*. *Animal Genetics* 2019, 50: 705-711 **(IF = 2,841; MNiSW = 140)**
3. **Krzeminska P**, Stachowiak M, Skrzypski M, Nowak T, Maslak A, Switonski M. Altered expression of *CYP17A1* and *CYP19A1* in undescended testes of dogs with unilateral cryptorchidism. *Animal Genetics* 2020, 51: 763-771 **(IF = 3,169; MNiSW = 140)**
4. **Krzeminska P**, Nowacka-Woszek J, Switonski M. Copy number variation of the *SRY* gene showed an association with disorders of sex development in Yorkshire Terrier dogs. *Animal Genetics* 2022, 53: 152-155 **(IF = 3,169; MEiN = 140)**
5. **Krzeminska P**, Nowak T, Switonski M. Isolated cryptorchidism in dogs is not associated with polymorphism of the *INSL3* and *AR* candidate genes. *Animal Genetics*, 2022, doi: 10.1111/age.13175 **(IF = 3,169; MEiN = 140)**

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Endokrynologii

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel./fax: +48 12 664 50 98

O istocie problematyki, w którą Pani mgr Paulina Krzemińska została włączona świadczą liczne badania patogenezy zaburzeń rozwoju płci ludzi i myszy, wskazujące na udział czynników genetycznych i epigenetycznych w ich powstawaniu, natomiast istotnym uzasadnieniem podjęcia badań stanowiących rozprawę doktorską jest nikłe rozpoznanie podłoża molekularnego wrodzonych wad rozwojowych psów, pomimo wiedzy o mutacjach genowych psa, odpowiedzialnych za choroby monogenowe.

Doktorantka prowadziła badania sekwencji, ekspresji i metylacji genów kandydujących w oparciu o ich biologiczną funkcję, zakładając, że wyniki tych analiz pozwolą na poznanie mechanizmów związanych z powstawaniem zaburzeń rozwoju płci samców psów. Dysponując bogatym materiałem (27 psów ze złożonymi wadami i 104 psy obciążone izolowanym wnętrstwem oraz 196 psów kontrolnych) wytyczyła ambitne zadanie, mające na celu poszukiwanie wariantów DNA związanych z zaburzeniami rozwoju płci o potencjalnym monogenowym uwarunkowaniu, lub izolowanym wnętrstwem, stanowiącym najczęściej występującą wadę poligenową psów. Dalszym celem była analiza porównawcza poziomu ekspresji genów związanych z syntezą testosteronu w jądrach niezstąpionych i zstąpionych z izolowanym, jednostronnym, pachwinowym wnętrstwem oraz ocena poziomu metylacji wysp CpG i występowania polimorfizmu w regionach promotorowych genów o zróżnicowanym poziomie ekspresji. Podjęcie powyższych badań oceniam zatem bardzo wysoko. Ich realizacja była możliwa dzięki środkom Narodowego Centrum Nauki w ramach dwóch projektów OPUS, prowadzonych przez prof. dr hab. Marka Świtońskiego,

Doktorantka w bardzo dobrze napisanym *Wstępie* omawia zjawisko determinacji płci męskiej, różnicowania męskich gonad ssaków i szczegółowo przedstawia biosyntezę androgenów przez płodowe komórki Leydiga, ilustrując czytelną ryciną zaangażowanie wielu enzymów w ten proces. Opisuje rozwój wewnętrznych i zewnętrznych narządów płciowych oraz wyjaśnia udział hormonów w procesie zstępowania jąder do worka mosznowego. Przytacza również dane o częstości występowania zaburzeń rozwoju płci psów i, co ważne dla całości rozprawy, skupia się na monogenowych zaburzeniach rozwoju płci samców psów i zapoznaje czytelnika z markerami genetycznymi zaburzeń o złożonym podłożu.

W kolejnym rozdziale przedstawia techniki badawcze stosowane w pracy i uzupełnia opis informatywnymi rycinami. Mgr inż. Krzemińska dokonywała izolacji DNA z krwi obwodowej i z gonad osobników, izolowała RNA i białka z gonad, prowadziła rozdziały elektroforetyczne wyizolowanych próbek RNA, produktów PCR i produktów PCR w czasie rzeczywistym. Analizowała ekspresję genów kandydujących dla zaburzeń rozwoju płci samców psa z prawidłowym genem *SRY*, stosując łańcuchową reakcję polimerazy oraz western blotting do oceny ekspresji genów, odpowiednio, na poziomie transkryptu i białka. Stosowała sekwencjonowanie DNA metodą Sanger, wykonywała cyfrowy, emulsyjny PCR w celu ustalenia

liczby kopii genu *SRY*, analizowała poziom metylacji DNA wykorzystując pyroseqwencjonowanie konwertowanego DNA, oraz prowadziła analizy *in silico*.

Do znaczących rezultatów należy zidentyfikowanie delecji dwóch nukleotydów w części kodującej genu *HSD17B3*, odpowiedzialnej w układzie homozygotycznym za nieprawidłowy rozwój zewnętrznych narządów płciowych u jamnika. Za ważne poznawczo oceniam wykazanie (z wykorzystaniem emulsyjnego PCR) obecności dwóch (zamiast trzech) kopii genu *SRY* u samców rasy yorkshire terrier, co Doktorantka powiązała z ryzykiem wystąpienia nieprawidłowego rozwoju płci. Wykrycie z kolei trzech kopii genu *SRY* w genomie wilka i jenota chińskiego oraz jednej w genomie lisa upoważniło Doktorantkę do stwierdzenia, że rodzinę *Canidae* cechuje zróżnicowana liczba kopii tego genu. Dalsze, istotne wyniki uzyskała dzięki analizie porównawczej poziomu ekspresji genów, których produkty biorą udział w syntezie steroidów w gonadach pachwinowych *versus* mosznowych. Stwierdziła bowiem zależność pomiędzy nieprawidłową lokalizacją gonad, a wyraźnie zróżnicowanym poziomem transkryptów trzech genów: *CYP17A1*, *AR* i *CYP19A1*. Notowała wysoce podwyższony poziom mRNA genu *CYP17A1*, kodującego enzym CYP17A1, odpowiedzialny za konwersję progesteronów w androgeny i genu *AR* kodującego receptor androgenowy (AR), zaś obniżony poziom mRNA genu *CYP19A1*, kodującego aromatazę, enzym warunkujący syntezę estrogenów z androgenów. W gonadach pachwinowych opisała obniżony, ujemnie skorelowany z ekspresją mRNA, poziom metylacji pojedynczego dinukleotydu CpG w regionie promotorowym *CYP17A1*, co bardzo dobrze uzasadniła, bazując na znanym epigenetycznym mechanizmie kontroli ekspresji niektórych genów, zależnym od metylacji cytozyn w tym regionie.

Na szczególne docenienie zasługuje zamieszczenie informacji o opublikowanych wynikach w ogólnodostępnej bazie internetowej OMIA (Online Mendelian Inheritance in Animals), która została utworzona na wzór bazy OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man).

Pragnę wyraźnie podkreślić poprawne uzasadnianie wyników i ich dyskusję w świetle oryginalnych badań światowych oraz wyciągnięcie dobrze sformułowanych wniosków. Już powyżej zaznaczyłam istotne poznawczo wyniki prowadzące do stwierdzenia, iż mutacje w genach zaangażowanych w biosyntezę i działanie androgenów mogą stanowić przyczynę zaburzeń rozwoju płci samców psa. Doktorantka zwraca też uwagę na brak związku pomiędzy polimorfizmem wielu badanych genów kandydujących (*SRD5A2*, *MAMLD1*, *AR*, *CYP17A1*, *HSD3B2*, *NR5A1*, *INSL3* i *ESR1*), a występowaniem zaburzeń rozwoju płci samców psa.

Stwierdzam, że przygotowanie rozprawy doktorskiej, której podstawą jest pięć publikacji została wzorcowo opracowana. Nie ma zbędnych powtórzeń, techniki badawcze zostały przedstawione zbiorczo, z bardzo czytelną ryciną 3 i Tabelą 1. W tej ostatniej Autorka uwzględniła referencje, co pozwala od razu zapoznać się z zakresem stosowanych technik w poszczególnych publikacjach cyklu. Rozdział *Wyniki* został przedstawiony w odniesieniu do każdej z publikacji, natomiast *Wstęp*, *Dyskusja* i *Wnioski* nadają opracowaniu wspólny charakter i pokazują poważny

cel pracy jakim są badania prowadzące do poznania mechanizmów związanych z powstawaniem zaburzeń rozwoju płci samców psów.

Jednym z elementów oceny recenzenta jest podzielenie się komentarzem, czy zwrócenie uwagi na braki lub nieścisłości. Z uznaniem przyznaję, że Autorka „niemal pozbawiła recenzenta tej możliwości” ponieważ precyzyjnie wyjaśnia i dojrzałe uzasadnia wyniki własne w dyskusji. Podam przykład: Doktorantka konkluduje, iż w jądrach ulokowanych w pachwinie *versus* jądra zstąpione dochodzi do znacznego obniżenia poziomu mRNA genu *CYP19A1* (ale nie białka), co przemawia za istnieniem mechanizmów kontrolujących ekspresję *CYP19A1* na etapie potranskrypcyjnym. Postawiony wniosek brzmi jasno, podzielam w pełni to wnioskowanie, ale równocześnie chciałam zasugerować możliwość występowania różnic gatunkowych, bowiem znane są dane literaturowe wskazujące podwyższony poziom mRNA genu *CYP19A1* i białka aromatazy u samców z eksperymentalnie lub genetycznie uwarunkowanym wewnątrzciem. Otrzymałam odpowiedź, w *Dyskusji* na str. 84 Doktorantka zaznacza, iż w większości prac traktujących o wewnątrzciem analizowano gonady zlokalizowane brzusznie.

I kolejna kwestia, także z dobrym uzasadnieniem. W ósmym wniosku Doktorantka zwraca uwagę na istotnie podwyższoną ekspresję transkryptu genu *AR* w jądrach pachwinowych psów, uzasadniając ten fakt zwiększoną (opisaną u psów) proliferacją komórek Sertolego, która może odpowiadać za powyższy wynik. Proszę jednak Doktorantkę o rozwinięcie, ponieważ wiadomo, że prawidłowych warunkach komórki Sertolego dorosłych ssaków są nieaktywne mitotycznie. Ich proliferacja zachodzi przed osiągnięciem dojrzałości płciowej, kończy się wraz z utworzeniem bariery krew-jądro (tzw. bariery komórek Sertolego) i stanowi marker ich zróżnicowania, np. u szczurów ma miejsce około 20 dnia życia.

Pozostając w bliskiej mi tematyce, prosiłabym o wypowiedź, czy Doktorantka zakłada możliwość innej interpretacji i odwrotnej sekwencji zdarzeń. Autorka pisze (str.82)... *niższy poziom mRNA genu aromatazy wynika z zaburzonego procesu produkcji komórek rozrodczych...* Moja propozycja brzmi: zaburzenie procesu produkcji komórek rozrodczych jest skutkiem niewystarczającego poziomu estradiolu, w wyniku obniżonej ekspresji genu *CYP19A1*". Czy znajduje Pani uzasadnienie dla tak postawionego wniosku?

Rozprawę Pani mgr inż. Pauliny Krzemińskiej cechuje edytorska poprawność i szczególna staranność w przygotowanie całości polskojęzycznego opracowania, dlatego w tekście pracy wynotowałam jedynie drobne błędy literowe, np. str. 50, winno być *GAPDH*. Doktorantka ustrzegła się wyrażen żargonowych, ryciny są bardzo starannie przygotowane i opisane. Pod względem metodologicznym nie znajduję uchybień.

Podsumowując, bardzo pozytywnie oceniam przedłożoną do recenzji dysertację i stwierdzam, że Pani mgr inż. Paulina Krzemińska zasługuje w pełni na nadanie stopnia doktora w dziedzinie

nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne. Doktorantka wykazała umiejętność pracy nowoczesnymi technikami i prawidłowo je wykorzystwała, całość opracowania wskazuje dużą wiedzę Doktorantki, umiejętność dyskusji wyników własnych i formułowania uzasadnionych wniosków. Atutem rozprawy jest wartość poznawcza badań, które istotnie poszerzyły wiedzę o podłożu molekularnym wad DSD psów, a ujęcie problemu w oryginalnych pracach badawczych pokazuje logiczne dążenie do rozwiązania postawionego celu, co niewątpliwie jest zasługą przygotowania Doktorantki przez Promotora, prof. dr hab. Marka Świtońskiego, którego wiedza i doświadczenie naukowe jest powszechnie znane i cenione.

Wniosek końcowy

Mając powyższe na uwadze stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Pauliny Krzemińskiej spełnia warunki stawiane pracom doktorskim w myśl artykułu 13 ust.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym, oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 poz. 1789) i wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr inż. Pauliny Krzemińskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne.

Ze względu na walory poznawcze badań, których wyniki zostały opublikowane w czasopismach indeksowanych w bazie JCR, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy w formie przewidzianej regulaminem macierzystej jednostki.



Prof. dr hab. Barbara Bilińska
czł.koresp.PAN

Kraków, 27 kwietnia 2022 r.