

dr hab. Kamila Kusz-Zamelczyk
ul. Strzeszyńska 32
60-479 Poznań
tel. +48/61/65 79 227
kamila.kusz-zamelczyk@igcz.poznan.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej

pt. „Polimorfizm i ekspresja wybranych genów kandydujących
psów z zaburzeniami rozwoju płci”

Doktorantka: Pani mgr Paulina Krzemińska

Rozprawa została wykonana w Katedrze Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt pod kierunkiem Prof. dr hab. Marka Świtońskiego. Dotyczy poszukiwań genetycznego podłoża zaburzeń rozwoju płciowego samców psa. Zaburzenia rozwoju płciowego w skrócie zwane DSD (ang. disorders of sex development) u człowieka występują z częstością 1:20 000 noworodków i stanowią poważny problem medyczny ale również związany z przypisaniem płci metrykalnej dziecku. Stąd precyzyjna diagnostyka hormonalna i molekularna jest potrzebna by jak najlepiej prowadzić pacjentów z DSD oraz dopomóc w wyborze płci metrykalnej. Jednak ze względu na niepełną wiedzę o czynnikach kierujących rozwojem płci, diagnostyka DSD wciąż jest daleka od ideału. Okazuje się, że DSD wśród psów jest znacznie częstsze niż u człowieka, lecz molekularne przyczyny tego rodzaju zaburzeń u psów są opisane tylko w niewielu przypadkach i jak dotąd są one zgodne z przyczynami nieprawidłowości rozwoju płciowego człowieka. Stąd uważam, że identyfikacja nowych przyczyn DSD psa mogłaby być cenna nie tylko punktu widzenia hodowlano-weterynaryjnego, lecz mogłaby przyczynić się również do wzbogacenia wiedzy o rozwoju płci ssaków, w tym człowieka.

W skład przedłożonej pracy doktorskiej wchodzi 5 publikacji oryginalnych, których Doktorantka jest pierwszym autorem oraz wyniki nieopublikowane, które razem tworzą całość tematyczną skupiającą się na poszukiwaniu podłoża genetycznego nieprawidłowości rozwoju zewnętrznych narządów płciowych męskich oraz wnętrza psów.

W sumie w 9 genach Autorka poszukiwała mutacji sprawczych lub polimorfizmów, które predysponowałyby do wystąpienia ww. nieprawidłowości rozwoju płciowego. Wybór tych genów był dobrze uzasadniony rolą ich ortologów w rozwoju płciowym innych gatunków ssaków.

W grupie samców z izolowanymi zaburzeniami rozwoju zewnętrznych narządów płciowych lub współistniejącymi z wnetrostwem Autorka poszukiwała mutacji w 7 genach (*AR*, *CYP17A1*, *HSD17B3*, *HSD3B2*, *MAMLD1*, *NR5A1*, *SRD5A2*). U jednego psa XY z nieprawidłowo rozwiniętymi zewnętrznymi narządami płciowymi oraz wnetrostwem zidentyfikowała homozygotyczną mutację genu kodującego enzym kluczowy dla syntezy testosteronu - *HSD17B3*. Mutacja ta powoduje pojawienie się przedwczesnego kodonu stop powyżej części kodującej domenę funkcjonalną białka, co przekonuje, że jest mutacją szkodliwą i mogłaby być przyczyną fenotypu DSD. Jednakże poziom testosteronu u osobnika z mutacją, choć niski (0.75 ng/ml), mieścił się w normie (0.5 – 6 ng/ml). Chciałabym usłyszeć podczas obrony jak Doktorantka interpretuje fakt, że pomimo stężenia testosteronu mieszczącego się w normie u psa występuje DSD, choć za przyczynę fenotypu uważana jest mutacja genu kluczowego dla syntezy testosteronu. Pragnę podkreślić, że identyfikacja mutacji *HSD17B3* jest dużym osiągnięciem, gdyż wcześniej w literaturze znana była tylko jedna mutacja sprawcza XY DSD psa. Ponadto w ww. siedmiu Autorka wykryła w sumie 40 polimorfizmów (w tym 9 nowych), lecz z wyjątkiem jednego wariantu zlokalizowanego w intronie, żaden nie występował z istotnie wyższą częstością w grupie zwierząt z DSD w porównaniu ze zdrowymi psami. Nie znaleziono zatem ich związku z badanymi fenotypami DSD.

Z kolei w grupie samców z izolowanym wnetrostwem zarówno brzuszynym jak i pachwinowym Autorka poszukiwała mutacji w genach *INSL3* i *ESR1*. Wykryła tam w sumie 8 polimorfizmów (2 na pewno znane już wcześniej gdyż w pracy podane są numery rs, resztę trudno ocenić gdyż numery rs nie są podane, lecz nie ma jasnej informacji, że są to polimorfizmy nowo zidentyfikowane przez Doktorantkę). Nie znaleziono jednak ich związku z wnetrostwem. Ponadto w grupie tej Autorka sprawdzała czy liczba powtórzeń mikrosatelitarnych w genie *AR* koreluje z wnetrostwem, lecz nie znalazła takiego związku.

Dodatkowo w grupie samców z izolowanym wnetrostwem pachwinowym Doktorantka sprawdzała czy zmiana poziomu mRNA *CYP17A1*, *CYP19A1*, *HSD3B2*, *HSD17B3*, *AR* oraz *ESR1* w gonadach może być przyczyną wnetrostwa. Nie znaleziono wprawdzie takiej zależności, jednak pokazano, że wnetrostwo powoduje zmiany poziomu ekspresji kilku z badanych genów. Idąc dalej sprawdzono czy różnica ekspresji ma związek z różnicą metylacji regionów promotorowych. W jednym przypadku (*CYP17A1*) wykryto taką korelację, co sugeruje, że podwyższona temperatura w niezstąpionych jądrach może wpływać pośrednio na metylację.

Ponadto przeprowadzono badania mające na celu sprawdzenie bardzo interesującej hipotezy, że obniżona liczba kopii genu *SRY* koreluje z fenotypem XY DSD. Wprawdzie w większości badanych ras nie zaobserwowano zmiennej liczby kopii *SRY* (u wszystkich badanych osobników z DSD oraz grupy kontrolnej obecne były 3 kopie), lecz wśród Yorkshire terierów zaobserwowano obecność 3 lub 2 kopii. Co ciekawe, obecność niższej liczby kopii *SRY* koreluje z nieprawidłowościami rozwoju płciowego, może zatem przyczyniać się do tych nieprawidłowości.

Do tej części pracy mam następującą uwagę: skoro *SRY* jest czynnikiem uruchamiającym mechanizm prowadzący do różnicowania gonady bipotencjalnej w jądro, to spodziewałabym się, że obniżenie liczby kopii genu *SRY* mogłoby wpływać na nieprawidłowy rozwój jąder (np. rozwój ovotestis), co z kolei pociągałoby za sobą nieprawidłowy rozwój wewnętrznych i zewnętrznych narządów płciowych. Zatem oczekiwałabym, że w tym przypadku nieprawidłowości zewnętrznych narządów płciowych nie byłyby izolowaną wadą lecz współistniejącą z nieprawidłowo rozwiniętymi zarówno gonadami jak i wewnętrznymi narządami płciowymi. By jak najlepszej zinterpretować wyniki, ważne jest odniesienie ich do fenotypu. Tymczasem fenotypy badanych w tej części pracy 19 psów z DSD nie są jednoznacznie opisane. W części pracy pt. „Materiał” (str. 33) Autorka pisze że były to psy, „u których zdiagnozowano zaburzenia rozwoju zarówno zewnętrznych jak i wewnętrznych narządów płciowych (obecność macicy i jajowodów)”. Z kolei w Rycinie 2 Autorka podsumowuje, że były to psy z zaburzeniami rozwoju zewnętrznych **i/lub** wewnętrznych narządów płciowych. Nie jest jasne u ilu z 19 osobników odnotowano nieprawidłowości rozwoju wewnętrznych narządów płciowych i czy były wśród nich Yorkshire teriery. W pracy oryginalnej znajdujemy informację, że były to osobniki z niejednoznacznymi zewnętrznymi narządami płciowymi. Nie ma tam jednak informacji o narządach wewnętrznych, znajdujemy natomiast informację, że fenotypy są opisane w innych dwóch publikacjach. W cytowanych pracach nie znalazłam jednak informacji dotyczących wewnętrznych narządów płciowych. Chciałabym by podczas obrony Doktorantka wyjaśniła co wiadomo na temat nieprawidłowości gonad oraz wewnętrznych narządów płciowych badanych w tej części pracy 19 psów z DSD ze szczególnym uwzględnieniem Yorkshire terierów.

Rozprawę przeczytałam z dużym zainteresowaniem. Doktorantka bardzo szczegółowo opisuje proces rozwoju płciowego ssaków oraz genetyczne podłoże DSD ze szczególnym uwzględnieniem badanych w niniejszej pracy wad. Dostarcza wartościowych wyników uzyskanych dzięki wykonaniu bardzo logicznego planu doświadczalnego, z wykorzystaniem stosownych technik molekularnych. Doktorantka dobrze interpretuje i dyskutuje uzyskane wyniki. Nie ukrywam jednak, że pracy nie analizowało się jej łatwo. Autorka opisuje wyniki uzyskane w ramach publikacji wchodzących w skład rozprawy w porządku chronologicznym (wg daty opublikowania). Tymczasem dla całościowego spojrzenia na pracę lepiej byłoby przedstawić

wyniki wg badanych fenotypów DSD, np. najpierw wyniki dotyczące nieprawidłowości rozwoju zewnętrznych narządów płciowych z towarzyszącym lub nie wnętrstwem, następnie wyniki dotyczące izolowanego wnętrstwa. Prawdopodobnie odrębną grupę stanowiłyby psy z nieprawidłowościami wewnętrznych narządów płciowych lecz jak już wspomniałam wcześniej nie mam pewności jak liczna była ta grupa.

Nie umknęły mojej uwadze pewne niedociągnięcia:

W streszczeniu zabrakło konkluzji, iż różnice poziomu ekspresji genów *CYP17A1*, *CYP19A1* i *AR* oraz poziomu metylacji pierwszego z nich pomiędzy gonadami niezstąpionymi oraz gonadami zstąpionymi są raczej skutkiem wnętrstwa a nie przyczyną tej wady.

We wstępie, w podrozdziale zatytułowanym „Rozwój grzebieni płciowych” wiele informacji ze str. 18 dotyczy determinacji płci męskiej, zatem winny znaleźć się w kolejnym podrozdziale opisującym różnicowanie gonad męskich (np. 1/izofорма *Wt1+KTS* jest kluczowa dla rozwoju grzebieni płciowych w kierunku jąder, 2/*Nr5A1* odpowiedzialny m.in. za rozwój komórek Leydiga a zatem rozwój gonad męskich).

W rozdziale „Hipoteza i cel badań” dobrze byłoby podkreślić, że nieprawidłowości rozwoju płciowego wśród psów są częste. W rozdziale tym Doktorantka pisze „Celem badań była analiza molekularna wybranych genów kandydujących dla zaburzeń rozwoju płci samców psa z prawidłowym genem *SRY*, obejmująca ...” (tu wymienione są poszczególne typy analiz). Uważam, że analiza sama w sobie nie jest celem lecz środkiem do osiągnięcia celu. W streszczeniu pracy cel jest dużo zgrabniej ujęty, mianowicie „Celem niniejszej pracy było poszukiwanie molekularnego podłoża DSD u samców psa”. Dalej Doktorantka wymienia dwie główne grupy analiz jakie przeprowadziła. 1/„poszukiwanie wariantów DNA związanych z zaburzeniami rozwoju płci o potencjalnym monogenowym uwarunkowaniu lub izolowanym wnętrstwem, które ma podłoże poligenowe”. Jakie zaburzenia rozwoju płci o potencjalnym monogenowym uwarunkowaniu Doktorantka miała na myśli? Warto byłoby je nazwać po imieniu. Ponadto dla jasności dobrze byłoby wymienić geny poddane tej części analizy (*AR*, *CYP17A1*, *HSD3B2*, *HSD17B3*, *INSL3*, *MAMLD1*, *NR5A1*, *SRD5A2*, *SRY*). 2/Druga grupa analiz to „porównawcza ocena poziomu ekspresji genów związanych z syntezą hormonów płciowych w jądrach niezstąpionych i zstąpionych psów ...”. Uważam, że dla jasności dobrze byłoby wymienić geny poddane tej części analizy (*CYP17A1*, *CYP19A1*, *HSD3B3*, *HSD17B3*, *AR*, *ESR1*).

We wstępie podrozdziału „Materiał” Doktorantka pisze iż „Obejmował on ogółem 27 psów z zaburzeniami rozwoju płci o potencjalnym podłożu monogenowym” i nie wyjaśnia jakie to były zaburzenia. Moim zdaniem dobrze byłoby napisać jakimi konkretnie zaburzeniami charakteryzowały się te psy.

Generalnie metody opisane są bardzo dokładnie, jednakże w podrozdziale „Pyroseqwencjonowanie konwertowanego DNA” zabrakło istotnych informacji. Doktorantka pisze „Pyroseqwencjonowanie zostało przeprowadzone dla DNA konwertowanego wodosiarczanem sodu ...”. Nigdzie w pracy nie ma informacji na czym polega pyroseqwencjonowanie, co pozostaje w dużym kontraście z faktem, iż wcześniej Doktorantka bardzo szczegółowo opisuje seqwencjonowanie metodą Sangera, która jest o wiele starsza i powszechniej stosowana niż pyroseqwencjonowanie. Ponadto Doktorantka nie wyjaśnia na czym polega wspomniana tu konwersja DNA (a przecież watro byłoby podać informację, że chodzi o konwersję **nie**zmetylowanej cytozyny do uracylu, podczas gdy zmetylowana cytozyna pozostaje w tej reakcji niezmienną).

Podrozdział „PCR w czasie rzeczywistym”: w opisie strategii projektowania starterów do RT-qPCR zabrakło informacji czy startery były zaprojektowane na złączeniach eksonów (czyli w tzw. exon-exon junction). Projektowanie starterów w takich miejscach pozwala uniknąć amplifikacji z matrycy genomowego DNA, którego resztki mogłyby zanieczyszczać preparat cDNA.

W podrozdziale „Wyniki” Doktorantka opisuje kolejno 5 publikacji oryginalnych a na końcu wyniki nieopublikowane. W opisie tych prac brakowało mi informacji pozwalających docenić nowatorstwo pracy, np. czy w genach, których poszukiwano mutacji sprawczych podobne analizy były wcześniej przeprowadzane u psów, czy były to badania pionierskie w tym gatunku zwierząt oraz czy wykryte mutacje były już wcześniej zidentyfikowane u psów, czy nowo zidentyfikowane przez Doktorantkę. Informacji takich można jednak było się doszukać w pracach oryginalnych. Bardzo dobrze natomiast, iż Doktorantka podkreślała, że wyniki prac zostały odnotowane w światowej bazie OMIA.

W opisie wyników publikacji nr 2 Doktorantka pisze „Dla jednego polimorfizmu typu SNP (g.12294546G>A) w genie *CYP17A1* test ilorazu szans wykazał istotną różnicę ($p=0,0403$) w częstościach obserwowanych alleli w grupie psów DSD i zdrowych, jednakże polimorfizm zlokalizowany był w intronie”. Doktorantka nie badała dalej związku tego polimorfizmu z DSD. Brakuje jednoznacznego komentarza na jakiej podstawie nie rozpatrywano tego wariantu dalej. Fakt, iż substytucja znajduje się w intronie nie oznacza, że jest ona neutralna. W oryginalnej pracy znajdujemy wprawdzie informację, że substytucja nie dotyczy ani donorowego ani akceptorowego miejsca splicingowego, jednak biorąc pod uwagę, że omawiana substytucja w intronie polega na zamianie G (guanozyny), warto byłoby rozważyć, iż zmutowany nukleotyd może reprezentować inne ważne dla splicingu miejsce, mianowicie tzw. miejsca rozgałęzienia.

Mojej uwadze nie uszły jeszcze drobne błędy, nieścisłości czy niedopowiedzenia, których nie będę odczytywać, lecz podaję je poniżej dla informacji Doktorantki.

Tytuły podrozdziałów nie w pełni oddają treść w nich zawartą lub są zbyt ogólne,

np. podrozdział 1.3. zatytułowany „Monogenowe zaburzenia płci **samców** psa” w około połowie objętości traktuje o mutacja sprawczych DSD u człowieka oraz o mutacjach *SOX9* u suk. Zatem tytuł nie w pełni odzwierciedla zawartość.

Z kolei podrozdział 1.4. „Markery genetyczne zaburzeń rozwoju płci o złożonym podłożu psa” traktuje wyłącznie o markerach wewnątrzcia i spodziectwa. Zatem dobrze byłoby podać bardziej specyficzny tytuł tego podrozdziału, tym bardziej, że podrozdział ten traktuje o dwóch głównych wadach rozwoju płciowego badanych w niniejszej pracy i warto byłoby wyraźnie podkreślić w podtytule, że dotyczy on właśnie wewnątrzcia i spodziectwa.

Kolejność opisywanych metod i tytuły podrozdziałów dotyczących metod

Podrozdział „Rozdział elektroforetyczny ...” umieściłabym za podrozdziałem „PCR w czasie rzeczywistym”, ponieważ najpierw należałoby opisać reakcję PCR a dopiero później rozdział elektroforetyczny produktów tej reakcji.

Podrozdziały „izolacja RNA”, „synteza cDNA”, „RT-PCR” umieściłabym jeden po drugim gdyż są one ze sobą ściśle powiązane (tymczasem w pracy są one rozproszone).

Przedstawienie informacji w nieuporządkowany sposób:

Tytuł podrozdziału 1.2.5. „**Proces rozwoju** męskich zewnętrznych narządów płciowych” zastąpiłabym następującym „**Rozwój** męskich zewnętrznych narządów płciowych”, by dla porządku w jednakowy sposób potraktować ten podrozdział z poprzednim zatytułowanym „**Rozwój** męskich wewnętrznych narządów płciowych”.

Tytuł podrozdziału 4.2.3. „izolacja RNA” zastąpiłabym następującym „izolacja RNA z **gonad**”, ponieważ tytuły podrozdziałów dotyczących izolacji DNA czy białek zawierają informację z jakiej tkanki dana izolacja była przeprowadzana. Dla porządku również w tytule tego podrozdziału należałoby zawrzeć informację z jakiej tkanki izolowany był RNA.

W podrozdziale „Materiał” Doktorantka przedstawia 5 grup badanych obejmujących psy z DSD oraz dobrane do nich grupy kontrolne. Ponieważ w niniejszej dysertacji Doktorantka ujęła również nieopublikowane wyniki badań, zabrakło mi tutaj opisu grup badanej i kontrolnej wykorzystanej w tej nieopublikowanej części badań (uwaga ta odnosi się również do Ryciny 2). Ponadto z opisu grup nie wynika, do których grup należało wyżej wspomnianych 27 psów „z zaburzeniami rozwoju płci o potencjalnym podłożu monogenowym”. Domyślać się należy, że zaliczały się one m.in. do grupy 4 w której było 19 psów, lecz nie wiadomo, w których grupach było pozostałych 8 psów. Zasadniczo opis każdej grupy zawiera informacje o 1/ liczebności grupy

badanej, 2/fenotypie(ach) DSD w badanej grupie, 3/rasach reprezentujących daną grupę, 4/rodzaju analizowanego materiału biologicznego, 5/informacje o grupie kontrolnej. Niestety informacje te nie są przedstawione w uporządkowany sposób, przez co tracą na przejrzystości, np. 1/informacja o fenotypach DSD znajduje się za informacją o liczebności w grupie 3 i 5, natomiast w grupach 1, 2, 4 za informacją o rasach, 2/w grupie 5 brak jest informacji o rasach. Same fenotypy są też przedstawiane niejednolicie, np. w opisie grupy 3 czytamy „80 psów z wnątrostwem (pachwinowe lub brzuszne, jedno- lub obustronne)”. Z tego opisu nie wynika czy było to wnątrostwo izolowane, natomiast w opisie grupy 5 czytamy „104 psy obciążone izolowanym wnątrostwem”. Z tego opisu z kolei nie wynika czy wnątrostwo było jedno- czy obustronne, pachwinowe czy brzuszne, a przecież wszystkie wymienione tu rodzaje wnątrostwa były obecne zarówno w grupie 3 jak i 5. Taki sposób opisu sprawia, że czytelnik zastanawia się czy te grupy różniły się rodzajami wnątrostwa czy nie. Ta sama uwaga tyczy się nazywania nieprawidłowości rozwoju płciowego w Rycinie 2. Tam w opisie grupy 1 mamy „psy z wnątrostwem i/lub spodziectwem”, podczas gdy u jednego z pięciu psów (12-letni Jack Russel Terrier) nie stwierdzono spodziectwa. Lepiej byłoby ująć to ogólnie „psy z wnątrostwem i/lub z nieprawidłowo wykształconymi zewnętrznymi narządami płciowymi”. Z kolei w opisie grupy 2 czytamy „psy z **nieprawidłowo wykształconymi** zewnętrznymi narządami płciowymi”, natomiast w opisie grupy 4 „psy z **zaburzeniami rozwoju** zewnętrznymi narządów płciowych”, a przecież chodzi o to samo – nieprawidłowo wykształcone narządy płciowe (lepiej używać jednolitej nomenklatury, szczególnie jeśli to dotyczy jednej ryciny). Poza tym w grupie 2 były również zwierzęta z wnątrostwem więc warto byłoby to zaznaczyć w rycinie podsumowującej, tym bardziej, że pies u którego wykryto mutację genu *HSD17B3* charakteryzował się również wnątrostwem.

Nieścisłości

Przełom str. 18-19 „Większość czynników zaangażowanych w proces różnicowania bipotencjalnych grzebieni płciowych w kierunku gonad męskich jest kodowana przez geny autosomalne, **a zatem** w pierwszych tygodniach życia obserwowany jest niski poziom ekspresji zarówno czynników ścieżki męskiej i żeńskiej w zarodkach XX oraz XY”. Czytając to zdanie czytelnik mógłby odnieść wrażenie, iż fakt zlokalizowania genów na autosomach jest przyczyną ich niskiej ekspresji, a tak przecież nie jest.

Str. 24. wers 5. Używając sformułowania „**u pacjentów** ze spodziectwem zidentyfikowano mutacje genów” nie jest jasne w jakich gatunkach zidentyfikowano mutacje sprawcze genów *SRD5A2*, *AR*, *WT1*, *HSD3B2* oraz warianty genów *MAMLD1*, *HSD17B3*, *HSD3B1*, *STARD3* i *STS*, ponieważ w pracy oprócz ludzi również psy z DSD nazywa się pacjentami (np. na str. 17). Zamiast

„u pacjentów” sugerowałabym napisać „u mężczyzn”. Analogiczna sytuacja wystąpiła w wersie 21 str. 24.

Opis publikacji nr 1, str. 58. Doktorantka pisze „Zasadniczym **celem pracy była analiza** molekularna części kodujących genów kandydujących (...), które są zaangażowane w rozwój zewnętrznych narządów płciowych samców”. Sadzę, że celem pracy było ustalenie czy warianty sekwencji genów kandydujących są przyczyną zaburzeń rozwoju zewnętrznych narządów płciowych i/lub wnętrza lub czy korelują z tymi zaburzeniami u samców psa. Chcę podkreślić, że w oryginalnej publikacji cel został sformułowany prawidłowo „Our main goal was to find the causative mutation or associated polymorphisms in 3 candidate genes”.

Niedopowiedzenia:

Str. 27 Doktorantka pisze, iż u suk XX DSD z brakiem *SRY* najczęściej poszukuje się mutacji sprawczych w genie *SOX9*. Jednak nie wynika z tego czy w końcu mutacje takie opisano czy nie, a przecież z cytowanej w tym miejscu pracy płyną konkretne wnioski, iż 1/CNV zlokalizowany powyżej *SOX9*, jest powiązany z fenotypem XX DSD w sposób specyficzny dla rasy 2/Duplikacja genu *SOX9* jest rzadką przyczyną XX DSD u psów.

W podrozdziale „Markery genetyczne zaburzeń rozwoju płci o złożonym podłożu psa” na str. 29 Doktorantka wymienia m.in. wyniki innych autorów oraz własne, dotyczące analizy ekspresji wybranych genów w gonadach zstąpionych i niezstąpionych. W tej części zabrakło mi choć krótkiej konkluzji na co te wyniki wskazują.

Metody i wszystkie czynności wykonywane w ramach danej metody Doktorantka opisuje bardzo szczegółowo, tak jak to jest opisane w instrukcjach technicznych (tzw. manualach), lecz bardzo często nie wyjaśnia w jakim celu dana czynność była wykonywana, np. w opisach izolacji czy RNA warto byłoby umieścić w jakim celu kolumnienki były wirowane na poszczególnych etapach (w celu związania kwasów nukleinowych / w celu pozbycia się niepotrzebnych substancji / w celu odzyskania czystego preparatu DNA lub RNA. Również dobrze byłoby napisać w jakim celu przeprowadzane były inkubacje (np. w celu lizy komórek lub konwersji DNA) oraz w jakim celu dodawano poszczególne roztwory (o ile nie wynikało to z nazwy roztworu, np. „roztwór lizujący”). Bez tych informacji opisy niektórych metod są czysto techniczne i właściwie nie trzeba by było ich umieszczać, lecz podać informację, że procedura była wykonywana zgodnie z instrukcją dołączoną przez producenta.

W opisie publikacja nr 2 Doktorantka pisze, iż „wytypowanie powyższych genów wynikało z ich roli w syntezie androgenów”. Należało dodać „lub działania androgenów” ponieważ wśród tych genów badany był również *AR* kodujący receptor androgenowy, który nie jest odpowiedzialny za syntezę lecz działanie androgenów.

W opisie publikacji nr 3 nie jest oczywiste, że jądra z których izolowano białka do analizy western blot pochodziły od zwierząt, u których wcześniej stwierdzono podwyższony poziom mRNA *CYP17A1* oraz obniżony poziom *CYP19A1* (można się domyślać, że tak było, lecz takiej informacji nie znalazłam). Dalej Doktorantka pisze, że przeprowadzono analizę poziomu metylacji regionów promotorowych 2 genów *CYP17A1* i *CYP19A1*. Następnie opisuje wynik, który uzyskała z analizy metylacji promotora *CYP17A1*, natomiast nie opisuje wyników dotyczących *CYP19A1*.

Drobne błędy

Streszczenie: Wyniki uzyskane w niniejszej pracy wskazują na brak związku wykrytych wariantów sekwencji ośmiu genów (*AR*, *CYP17A1*, *ESR1*, *HSD3B2*, *INSL3*, *MAMLD1*, *NR5A1*, *SRD5A2*) z badanymi fenotypami DSD psa. Informację tę przekazałbym w streszczeniu jednym zdaniem. Tymczasem Doktorantka pisze „polimorfizmy szeregu badanych genów nie wykazały związku z fenotypem DSD” i nie wymienia tych genów. Podaje natomiast kilka ich przykładów, niepotrzebnie przy tym dwukrotnie wspomina gen *AR*. Ostatecznie czytelnik na podstawie streszczenia nie wie w ilu genach poszukiwano wariantów sekwencji związanych z DSD. Wprawdzie w części streszczenia dotyczącej materiałów i metod wymienione są wszystkie geny, których analizy molekularnej podjęto się w niniejszej pracy (11), lecz z informacji tej nie wynika, w których z nich poszukiwano mutacji, a w których analizowano poziom ekspresji w gonadach wnątrów.

str. 54 W opisie metody western blot czytamy „Do analizy ... pomiaru intensywności prążków dla **genów** badanych i **genu** referencyjnego wykorzystywano program ImageLab”. W metodzie tej nie badamy genów lecz białka.

Daleko idące skróty myślowe

Str. 28. Doktorantka opisując mutacje genu *NR5A1* człowieka oraz psa związane z DSD pisze „Co istotne, wiele mutacji występowało w układzie heterozygotycznym, podobnie jak u wspomnianego yorkshire terriera z DSD, co potwierdza ważną rolę czynnika SF1 w rozwoju płci”. Owszem, wykrycie związku pomiędzy mutacjami *NR5A1* a DSD potwierdza kluczową rolę kodowanego przez ten gen białka w rozwoju płci, lecz fakt, iż mutacje *NR5A1* występują w układzie heterozygotycznym świadczy o tym, iż dla prawidłowego odegrania roli przez SF1 istotne jest osiągnięcie określonego stężenia ("dawki") wynikającego z obecności dwóch prawidłowych alleli. Obecność wyłącznie jednego prawidłowego allelu jest niewystarczająca dla osiągnięcia wymaganej dawki białka (haploinsuficjencja).

str. 44 „Elektroforezę ... stosowano m.in. dla każdej pary starterów wykorzystywanych w reakcjach PCR”. Przecież elektroforezie nie poddawano starterów, lecz produkty amplifikacji.

str. 48 W podrozdziale 4.2.9. „PCR emulsyjny – ustalenie liczby kopii genu SRY” Doktorantka pisze sondy dla **badanych genów** były wyznakowane barwnikiem fluorescencyjnym”. Przecież w tej części pracy badany był tylko jeden gen (*SRY*). Pozostałe dwa to geny referencyjne.

str. 50 W rozdziale wyniki Doktorantka pisze „Analizy względnego poziomu ekspresji mRNA zostały **zaplanowane** dla czterech genów (...) zaangażowanych w syntezę hormonów płciowych oraz dwóch genów referencyjnych (...). W tym celu wykorzystano preparaty RNA ...”. W jakim celu? W celu analizy? Analiza sama w sobie nie jest celem. W rozdziale Wyniki nie powinno się pisać co zostało zaplanowane lecz co zostało wykonane.

Tzw. literówki, błędy stylistyczne, anglicyzmy, żargon

W streszczeniu popełniono błąd w nazwie genu *SRD5A2* stosując 1 zamiast 2.

str. 12 W rozwinięciu skrótu CBX2 napisano „białko” zamiast „białko”

str. 16, drugi wers podrozdziału 1.1. napisano „dotyczące” zamiast „dotyczących”

str. 18 napisano „wpływając” zamiast „wpływa”

str. 23 napisano „receptorami typu 2 (AMHR2), które obecne są w tkance ...” zamiast „receptorem typu 2 (AMHR2) obecnym w komórkach tkanki ...”

str. 25 napisano „receptorami RXFP2, obecnymi głównie w jądrowodzie” zamiast „receptorem RXFP2 obecnym głównie w jądrowodzie”. Jeśli nazwy hormonów AMH i INSL3 w zdaniu używane są w liczbie pojedynczej, to w tym samym zdaniu również nazwy ich receptorów (odpowiednio AMHR i RXFP2) powinny być użyte w liczbie pojedynczej.

str. 28 napisano „wystąpieniem” zamiast „wystąpienia”

str. 31 Wersy 7 – 13 błąd stylistyczny: zbyt duże nagromadzenie zaimków (ich, takich) odnoszących się do zaburzeń rozwoju płci.

str. 43, 51. Napisano „koncentracja” zamiast „stężenie” w odniesieniu do stężenia RNA czy DNA (anglicyzm)

str. 56 napisano „do predykcji” zamiast „do przewidywania” (anglicyzm)

str. 67 napisano „stwierdzona 2 kopie” zamiast „stwierdzono 2 kopie”

str. 68 napisano „W celu sprawdzeniu” zamiast „sprawdzenia”

str. 70 napisano „ dla 104 psów obciążonym” zamiast „obciążonych”

str. 70, wers 2-3 „w obu grupach” powtórzone niepotrzebnie w jednym zdaniu

str. 45 „prążek/prążki” (żargon)

Nadużywanie słowa „móc” (mogą, może), np.

str. 18 „przewody przyśródnercowe, z których **mogą** rozwinąć się jajowody” (powinno być: z których u samic rozwijają się jajowody)

str. 20 „brak ekspresji *SRY* ... prowadzić **może** do zahamowania procesu różnicowania gonady męskiej” (powinno być: brak ekspresji *SRY* ... prowadzi do ...)

str. 27 „Zjawisko to wskazywać **może** na podwyższoną ekspresję *SOX9*, która **może** wynikać z duplikacji”

Nadużywanie słowa „dla”, np.

str. 58 „Amplifikacja i sekwencjonowanie *SRY* **dla** każdego osobnika potwierdziły obecność tego genu” - słowo „dla” jest tu zbędne.

str.58 „W celu poszukiwania mutacji sprawczej **dla** obserwowanych fenotypów, przeprowadzono Sekwencjonowanie ...” - słowo „dla” jest tu zbędne.

str. 60 „Sekwencjonowanie wykonano **dla** 6 genów ...” - słowo „dla” jest tu zbędne.

str. 60 „ ... z których pierwszy jest receptorem **dla** androgenów” - słowo „dla” jest tu zbędne

Wniosek końcowy:

Rozprawę uważam za bardzo wartościową. Należy podkreślić, iż liczba analizowanych genów wraz z liczebnością grup badanych i kontrolnych wiązała się z olbrzymim nakładem pracy, której efektem jest imponująca liczba prac oryginalnych wchodzących w skład rozprawy. Na szczególną uwagę zasługuje 1/zidentyfikowanie homozygotycznej, szkodliwej mutacji genu *HSD17B3* u psa z nieprawidłowo rozwiniętymi zewnętrznymi narządami płciowymi i wnętrzem oraz 2/ wykrycie zmienności liczby kopii *SRY* u yorkshiere terriera i obserwacja, że obniżona liczba kopii koreluje z XY DSD. Rozprawa z pewnością spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim, dlatego z pełnym przekonaniem wnioskuję o dopuszczenie Pani mgr. Pauliny Krzemińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

