



Dr hab. inż. Artur Gurgul, Prof. UR
Ośrodek Medycyny Eksperymentalnej i Innowacyjnej
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
ul. Rędzina 1C, 30-248 Kraków

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Łukasza Wodasa
pt.: „*Ocena związku polimorfizmów genów kodujących białka serwatkowe mleka klaczy (LGB1, LGB2, LALBA) z poziomem ich ekspresji*”

Ogólna charakterystyka pracy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana w Katedrze Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, pod opieką naukową dr hab. Jakuba Cieślaka, oraz promotora pomocniczego dr inż. Mariusza Maćkowskiego. Rozprawę doktorską stanowią dwie oryginalne prace naukowe – niżej wyszczególnione – opublikowane w języku angielskim w czasopismach z listy Journal Citation Reports, których łączny wskaźnik IF (wg. danych zamieszczonych w dysertacji, zgodnie z rokiem publikacji) wynosi 3,651. Punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, jest podana również z uwzględnieniem dat publikacji poszczególnych artykułów i wynosi, odpowiednio dla artykułu pierwszego - 20 pkt (wykaz MNiSW 2017) i drugiego - 100 pkt (wykaz MNiSW 2019). W przeliczeniu na punktację MNiSW z roku 2019, artykuły mają sumaryczną wartość 140 punktów.

Artykuły wchodzące w skład dysertacji:

1. Wodas Ł., Maćkowski M., Borowska A., Pawlak P., Puppel K., Kuczyńska B., Czyżak-Runowska G., Wójtowski J., Cieślak J. 5'-flanking variants of the equine α -lactalbumin (LALBA) gene – relationship with gene expression and mare's milk composition. *J. Anim. Feed Sci.* 2018;27(4):317–326. DOI: <https://doi.org/10.22358/jafs/97175/2018>

2. Wodas Ł., Maćkowski M., Borowska A., Puppel K., Kuczyńska B., Cieślak J. Genes encoding equine β -lactoglobulin (LGB1 and LGB2): Polymorphism, expression, and impact on milk composition. PLoS One. 15(4):e0232066. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232066>

W/w publikacje powstały w ramach finansowania przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursów Sonata (pod kierownictwem Promotora rozprawy) i Preludium (pod kierownictwem Doktoranta). Obie publikacje są współautorskie, a Doktorant jest w nich pierwszym autorem. Swoją udział w przygotowaniu publikacji Doktorant określił w pierwszej i drugiej pracy na 55 i 60%, odpowiednio, co zostało potwierdzone przez pozostałych współautorów w załączonych oświadczeniach. Udział Doktoranta w badaniach obejmował między innymi: uczestnictwo w pozyskaniu materiału, izolacji DNA i dalszych jego analizach, przygotowaniu reakcji ilościowego PCR w czasie rzeczywistym, analizach z zakresu bioinformatyki oraz w przygotowaniu wstępnej i ostatecznej wersji manuskryptów. Publikacje stanowiące podstawę dysertacji zostały opatrzone obszernym opracowaniem w języku polskim, w którego skład wchodzi: wykaz skrótów, streszczenie (również w języku angielskim), wstęp, hipoteza i cel badań, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, wykaz cytowanej literatury oraz oświadczenia współautorów. Opracowanie obejmuje także kopie oryginalnych prac naukowych, które są przedmiotem ocenianej rozprawy.

Ocena opracowania w języku polskim

Opracowanie w języku polskim zostało opatrzone tytułem spinającym tematykę badawczą obu prac oryginalnych. Brzmienie tytułu [tj.: „Ocena związku polimorfizmów genów kodujących białka serwatkowe mleka kłaczy (*LGB1*, *LGB2*, *LALBA*) z poziomem ich ekspresji”] mogło zostać jednak bardziej doprecyzowane. W obecnym kształcie nie wskazuje ono w jakich komórkach czy tkankach badana była ekspresja. Tytuł nie sugeruje także ważnej analizy zawartej w dysertacji, dotyczącej związku polimorfizmu i ekspresji badanych genów na poziomie mRNA z zawartością poszczególnych białek i innych składników w mleku, a więc oznaczeń na poziomie białka i analizy składu mleka.

We wstępnych częściach opracowania Autor uzasadnia potrzebę i znaczenie prowadzonych badań, popierając swoje tezy licznymi danymi literaturowymi. Autor wskazuje na potrzebę poszukiwania nowych preparatów mlekozastępczych, uzupełniających wachlarz obecnie stosowanych preparatów oraz podkreśla niską immunogenność mleka końskiego oraz walory jego składu wykazującego podobieństwo do mleka kobiecego. Szczególnie ważna w tym aspekcie wydaje się być niska alergenicność mleka kłaczy, w stosunku do mleka krowiego, które jest coraz częściej przyczyną reakcji alergicznych u ludzi. Mleko kłaczy przedstawiane jest także jako preparat leczniczy w przypadku chorób sercowo-naczyniowych czy stanów zapalnych odcinków przewodu pokarmowego.

Dane te pozwalają uznać przedmiot badań, jakim jest mleko końskie, za ciekawy i przyszłościowy ze względu na ciągle poszukiwana nowych źródeł żywności funkcjonalnej i żywności specjalnego przeznaczenia. W dalszej części Autor szczegółowo opisuje skład mleka końskiego i uzasadnia wybór alfa-laktoalbuminy i beta-laktoglobuliny jako przedmiotu szczegółowych badań. Wybór alfa-laktoalbuminy Doktorant uzasadnia tym, że jest ona jednym z głównych białek serwatkowych w składzie mleka końskiego i ma znacznie dla zdrowotności źrebiąt (i potencjalnie innych konsumentów) jako czynnik antybakteryjny i immunostymulacyjny. Autor podkreśla także, że białko to uważane jest także za istotny czynnik alergizujący, a więc jego znaczenie dla przydatności konsumpcyjnej mleka jest kluczowe. Wybór beta-laktoglobuliny uzasadniany jest faktem, że jest to główne białko serwatkowe w mleku klaczy o wciąż niewystarczająco poznanych funkcjach, przy czym nie występuje ona w mleku kobiecym. Autor zaznacza dalej, że wiedza na temat polimorfizmu genów kodujących wspomniane białka u koni jest znikoma a mogą one mieć znacznie dla jakości, składu oraz przydatności technologicznej i alergienności produktów pozyskanych z mleka klaczy. Uzasadnienie wyboru przedmiotu badań uznaję za wystarczające, a sam przedmiot badań za ciekawy i wartościowy.

Po wstępnym rozdziale pracy Autor zamieścił opis hipotezy i celu prowadzonych badań. W mojej ocenie hipoteza jest postawiona prawidłowo, choć nieco skrótowo. Zarówno we wstępie jak i hipotezie brakuje choćby próby zarysowania mechanizmu jaki mógłby być podłożem zależności pomiędzy badanymi białkami a zawartością np. tłuszczu w mleku. Taką zależność Autor opisuje później dla beta-laktoglobuliny i poziomu laktozy, co jednak nie tłumaczy istnienia innych zależności pomiędzy badanymi białkami i składem mleka. Cele badań są nakreślone jasno, choć również nieco zbyt skrótowo. Przykładowo, cel drugi powinien zostać uzupełniony o informacje, że analiza względnego poziomu transkryptów dotyczyła ich zmienności w różnych fazach laktacji.

W dalszej części opisu Autor zawarł trzynastostronicowy opis materiału badawczego i zastosowanych metod. Opis materiału Autor rozpoczyna od stwierdzenia, że został on podzielony na dwie części, jednak nie mówi wyraźnie co stanowiło ten materiał. Podział ten ilustruje także schemat, który nie uwzględnia jednak rozróżnienia pomiędzy DNA a RNA i tkankami z jakich one pochodzą.

Do identyfikacji polimorfizmu w badanych genach wykorzystano 96 prób pozyskanych od 12. ras koni. Liczebność prób można by uznać za wystraszającą, szczególnie gdy jako osobny cel pracy wyszczególniono analizę polimorfizmu badanych genów. W przeciwnym wypadku, poszukiwanie wariantów genów u ras niewykorzystanych do analizy ekspresji byłoby bezcelowe, ponieważ szereg wariantów genetycznych segreguje jedynie w obrębie ras blisko spokrewnionych. W związku z tym, warianty wykryte u odległych filogenetycznie ras nie są użyteczne do badań asocjacyjnych u polskich ras koni. W dalszych częściach opisu Autor przedstawia sposób poboru prób mleka do analizy jego składu oraz analizy ekspresji genów. O ile nie mam zastrzeżeń co do sposobu poboru prób do analizy

składu mleka, o tyle budzi pewne obawy sposób zabezpieczenia komórek mleka do badania ekspresji genów. Autor opasuje, że niewielka porcja mleka była oddzielana do próbek 15 ml i zamrażana w ciekłym azocie. W dalszej części opisu metodyki Autor podaje informację, że po rozmnożeniu mleko to było poddawane wirowaniu do uzyskania osadu komórkowego, z którego izolowano RNA. Moje obawy związane są z faktem, że w przypadku mrożenia jakichkolwiek komórek zawieszonych w roztworze bez wykorzystania krioprotektantu dochodzi do zniszczenia ich błony komórkowej i emisji cytoplazmy do roztworu (po rozmrożeniu). Odwirowanie tak traktowanych prób powinno skutkować peletowaniem pozostałości komórkowych i pozostaniem cytoplazmy w supernatancie. Podejrzewam jednak, że niektóre komórki mogły przetrwać etap mrożenia i dzięki temu procedura izolacji RNA była nadal skuteczna. Modyfikacja tej metody w przyszłości obejmująca wirowanie świeżego mleka i mrożenie komórek po usunięciu supernatantu mogłaby jednak zwiększyć ilość i jakość pozyskiwanego RNA.

W kolejnych częściach pracy Autor bardzo szczegółowo opisuje metodykę identyfikacji polimorfizmu w analizowanych fragmentach genów. W genie *LALBA* analiza obejmowała region flankujący 5' natomiast w obu genach *LGB* region 5' oraz część strukturalną genów. Autor nie podaje przyczyny dla której część strukturalna genu *LALBA* została pominięta w tym badaniu. Niemniej jednak, na uwagę zasługuje fakt, że sekwencjonowanie tak dużych fragmentów genów metodą *Sangera* jest bardzo pracochłonne, co podkreśla ogrom pracy i trud włożony w otrzymanie opisywanych wyników. Opis całej procedury jest czytelny a dobrane parametry reakcji wydają się być prawidłowe. Dalej Autor opisuje przebieg reakcji *real-time qPCR*. Opis ten skłania mnie do zadania dwóch pytań. Po pierwsze, czy przygotowane krzywe standardowe były wykorzystane do określenia efektywności amplifikacji czy do przeprowadzenia absolutnej kwantyfikacji? Po drugie, czy dwa powtórzenia techniczne są wystarczające do identyfikacji wartości odstających? Myślę, że dyskusja w tym zakresie rozwieje moje wątpliwości. Pomimo obietnic w tytule podrozdziału, nie znalazłem w nim opisu badania składu mleka, który był istotnym elementem oznaczeń w prezentowanych badaniach. W kolejnym podrozdziale przedstawiono opis analizy statystycznej danych uzyskanych w ramach omawianych badań, jak również wzmiankę dot. oceny składu mleka i profilu zwartych w nim białek, która powinna być zamieszczona w rozdziale poprzednim.

W dalszej części opisu Autor zamieszcza wyniki analiz, z podziałem na poszczególne publikacje. Opis pierwszej pracy, poświęconej alfa-laktoalbuminie, Autor rozpoczyna od przypomnienia celu badań oraz uzasadnia przyczynę ich podjęcia. Dalej zamieszcza opis wykrytych polimorfizmów oraz analizę ich rozpowszechnienia wśród badanych ras. Kolejny fragment dotyczy potencjalnego wpływu wykrytych wariantów na aktywność promotora genu określoną w oparciu o analizę *in silico* miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych. Analiza ta, pomimo, że bardzo ciekawa, jest niespodziewana,

ze względu na fakt, że nie została opisana w części metodycznej opisu. Kolejny akapit dotyczy zmian w profilu ekspresji genu *LALBA* na poziomie RNA i białka w przebiegu laktacji, i dalej, zmian w składzie mleka następujących w poszczególnych fazach laktacji. W kolejnym akapicie Autor przechodzi do opisu wyników analizy asocjacyjnej genotypów zidentyfikowanych wariantów i zawartości poszczególnych składników w mleku. Opisy te nie budzą zastrzeżeń, są precyzyjne i wykorzystują odpowiednie słownictwo.

Po części wynikowej, Autor przedstawia wkład własny w opisywane badania, polegający na: udziale w zebraniu materiału, pisaniu artykułu i przygotowaniu u odpowiedzi na recenzje w czasopismach oraz przeprowadzeniu izolacji DNA, projektowaniu starterów, optymalizacji warunków reakcji i przeprowadzeniu PCR i qPCR. Autor był także odpowiedzialny za sekwencjonowanie fragmentów genów, część bioinformatyczną analiz oraz interpretację wyników. Wkład ten wydaje się być wszechstronny i świadczy o dobrym przygotowaniu Doktoranta zarówno od strony badań laboratoryjnych jak również późniejszych prac niezbędnych do pełnego opracowania wyników badań naukowych i ich prezentacji w postaci publikacji.

W ostatnim akapicie dot. wyników pierwszej publikacji Autor prezentuje inne wyniki niebędące przedmiotem publikacji a powiązane tematycznie z prezentowaną pracą. Nie tłumaczy jednak dlaczego nie znalazły się one w obrębie pierwszej publikacji. Osobiście żałuję, że tak się nie stało, ponieważ uzupełniłyby one informację na temat zmienności i znaczenia polimorfizmu części kodującej genu *LALBA* dla zmienności składu mleka u polskich ras koni.

Dalsza część wyników dot. badań zamieszczonych w drugiej publikacji, które opisane są w sposób bliźniaczy jak przy opisie pracy pierwszej. Dodatkowym aspektem badań była tu ocena nierównowagi sprzężeniowej w obrębie genów *LGB*. Ta analiza, pomimo, że wartościowa, również nie została opisana w części metodycznej. Opis, podobnie jak poprzednio, zakończony jest przedstawieniem wkładu własnego Doktoranta w prowadzone badania, który uwzględnia dodatkowo kierownictwo grantu w konkursie Preludium, w ramach którego sfinansowano omawiane badania.

Dyskusja dotycząca obu prac jest skonstruowana w sposób prawidłowy i w swoim toku przypomina cele i uzasadnia celowość pojęcia opisywanych badań oraz odnosi się krytycznie do wyników własnych badań na tle badań światowych. Podaną argumentację odnośnie rozbieżności i przyczyn różnic w wynikach badań własnych i badań innych autorów uznaję za przekonującą, a sam tok dyskusji za ciekawy i dobrze zaplanowany. W podsumowaniu, swój nowatorski wkład w dostępną wiedzę na temat genów *LALBA* i *LGB* Autor upatruje w analizach ich części promotorowych i ocenie związku wykrytych polimorfizmów z poziomem ekspresji ich transkryptów oraz składem mleka kłaczy. Skoda jedynie, że Autor nie podjął się próby wyjaśnienia przyczyn związku polimorfizmu genu *LALBA* z zawartością tłuszczu w mleku. Związek ten wydaje się być zaskakujący i powinien zostać

przedyskutowany na tle dostępnych badań światowych odnośnie mechanizmu syntezy składników tłuszczu mlekowego.

Polskojęzyczny opis badań kończy się pięcioma obszernymi wnioskami. Opis zawarty w tych pięciu punktach trafnie i syntetycznie opisuje otrzymane wyniki badań, jednak w dużym stopniu nie ma charakteru wniosków tylko pewnego rodzaju podsumowania. We wnioskach znalazł się także opis wyników badań niepublikowanych, co trudno mi ocenić pod kątem formalnym, ze względu na brak jasnych wytycznych odnośnie przygotowania polskojęzycznych opracowań zawartych w rozprawach doktorskich bazujących za zbiorach publikacji.

Pomimo szeregu uwag krytycznych, które z przyzwyczajenia recenzenta zawarłem w powyższej ocenie polskojęzycznego opisu badań, przedstawione opracowanie uważam za poprawne a zawarte w nim wiadomości za wystarczające. Opis jest czytelny, przejrzysty, jasny dla czytelnika, a język opracowania jest więcej niż poprawny i wystarczająco ścisły. Celowo w tym miejscu nie podejmuję się oceny merytorycznej wyników badań, gdyż ta w mojej ocenie powinna zostać przeprowadzona przy analizie samych publikacji naukowych, będących przedmiotem niniejszej dysertacji.

Wartość merytoryczna publikacji naukowych

W wyniku dynamicznego rozwoju wszystkich dziedzin nauki jaki nastąpił w ostatnich latach, w obecnych czasach bardzo trudno jest znaleźć zagadnienie badawcze, które wciąż jest mało poznane a otrzymane wyniki stanowią nowatorski wkład do obecnego stanu wiedzy. Niemniej jednak, Doktoratowi i jego Promotorom udało się wejść w obszar tematyczny, dla którego dostępne wyniki badań są nieliczne a ich znacznie dla nauk o zwierzętach jest duże. Pomimo, że podobne badania były prowadzone u innych gatunków ssaków, badania dotyczące związku polimorfizmu genów kodujących składniki mleka kłaczy z ich ekspresją oraz składem mleka, w mojej ocenie stanowią oryginalny wkład w ten obszar wiedzy. Fakt, że analizy były prowadzone na poziomie polimorfizmu genetycznego, transkryptu i białka, sprawia, że opisane badania mają charakter kompleksowy i dają znacznie bardziej szczegółowy wgląd w mechanizm regulacji syntezy analizowanych białek mleka niż badania genetyczne sensu *stricto*. W obu pracach oryginalnych przedmiotem analiz było mleko kłaczy. Pomimo, że mleko kłaczy ma niski potencjał jako powszechna alternatywa dla mleka krowiego, to stanowi ono wartościowy surowiec dla produkcji żywności specjalnego przeznaczenia czy produkcji preparatów leczniczych. W tym kontekście, skład mleka i jego regulacja na poziomie genetycznym wydają się ważnym przedmiotem badań, którego analizy mogą mieć w perspektywie istotne znaczenie dla ekonomiki hodowli koni. Wykorzystany warsztat badawczy obejmuje szereg technik z zakresu genetyki, biochemii i statystyki, co świadczy o odpowiednim przygotowaniu merytorycznym Doktoranta, pozwalającym mu na kompleksową analizę opracowywanych zagadnień.

Wyniki uzyskane w ramach pierwszej pracy pozwoliły na oznaczanie polimorfizmu regionu promotorowego genu *LALBA* u 12 ras koni oraz ocenę jego związku z ekspresją tego genu na poziomie transkryptu i białka oraz jego wpływu na skład mleka kłaczy. Autorzy zidentyfikowali cztery nowe polimorfizmy, jednak nie miały one związku z poziomem ekspresji genu *LALBA* na żadnym z poziomów. Ten negatywny wynik obniża nieco wartość merytoryczną pierwszej pracy, jednak ze względu na fakt, że postawiona hipoteza badawcza o potencjalnej regulacji ekspresji genu przez polimorfizm promotora jest zasadna, nie powinno to wpłynąć na końcową ocenę wartości merytorycznej tych badań. Autorzy wykryli także spodziewaną zmienność międzyrasową na poziomie transkryptu i białka alfa-laktoalbuminy oraz zmiany w poziomie ekspresji genu *LALBA* w przebiegu laktacji. Najważniejszym wynikiem pierwszej pracy jest jednak identyfikacja statystycznie istotnego związku jednego z wykrytych SNP ze składem mleka (tj. zawartością białka i tłuszczu). Czyni to zidentyfikowany SNP potencjalnym markerem selekcyjnym dla cech składu mleka koni.

Druga z prezentowanych prac wpisuje się w ten sam nurt badań, jednak dotyczy genów *LGB1* i *LGB2*. Układ doświadczenia jest bliźniaczy jak w pracy pierwszej. W ramach badań w obu analizowanych genach u 12 ras koni Autorzy zidentyfikowali 83 miejsca polimorficzne, spośród których dziewięć nie zostało wcześniej opisanych. Analiza związku wszystkich zidentyfikowanych wariantów z ekspresją genów i składem mleka wykazała szereg istotnych zależności, przykładowo, dwa SNP w genie *LGB1* były zasocjowane z zawartością białka w mleku. Analizy wykazały także, że rasa i faza laktacji są istotnymi czynnikami wpływającymi na ekspresję genów *LGB*. Pozytywny wynik badań zawartych w niniejszej pracy czyni ją bardziej wartościową od pracy pierwszej, a otrzymane wyniki dostarczyły nowej oryginalnej wiedzy w tym obszarze badawczym.

Obie prace oceniam pod względem merytorycznym oraz pod względem oryginalności i zasadności podjętych badań wysoko a sam sposób opisu i konstrukcje prac oceniam bardzo dobrze. Obie prace stanowią ważny wkład w swoim obszarze i z pewnością świadczą o dobrym przygotowaniu Doktoranta do dalszej pracy naukowej.

Podsumowanie

Podsumowując, pomimo pewnych niedociągnięć, które z obowiązku recenzenta wykazałem w polskojęzycznym opracowaniu, całość dysertacji oceniam pozytywnie. Wartość punktowa publikacji wchodzących w skład dysertacji mogłaby być nieco wyższa lub zostać uzupełniona przez pracę przeglądową dotyczącą badań światowych w tym zakresie. Niemniej jednak oryginały wkład i jakość opisu zaprezentowanych prac czyni je w mojej ocenie wystarczające do promocji Autora na stopień naukowy doktora.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny praca pt.: „*Związek wybranych genów warunkujących skład mleka klaczy (LALBA, LGB1, LGB2) z poziomem ich ekspresji*” spełnia wszystkie wymagania określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki w związku z ustawą Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, i niniejszym **wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Zootechniki i Rybactwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie Pana mgr inż. Łukasza Wodasa do dalszych etapów procedury ubiegania się o stopień naukowy doktora.**

Artur Guvqul