

Prof. IGC PAN dr hab. Monika Frączek
Instytut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk
ul. Strzeszyńska 32
60-479 Poznań

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Bernadetty Pawlickiej

pt.: „Określenie funkcji genu *Pxt1* i jego współdziałania z genem *Bag6* w kontroli jakości plemników”

wykonanej w Pracowni Genetyki i Ewolucjonizmu Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych

Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

pod kierunkiem dr hab. Pawła Grzmila, prof. UJ

Ocena wartości naukowej rozprawy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Bernadetty Pawlickiej dotyczy ważnego i aktualnego zagadnienia naukowo-badawczego związanego z poznaniem molekularnych mechanizmów regulacji procesu spermatogenezy. Badania modelowe na zwierzętach potwierdzają istotne znaczenie apoptozy dla zachowania homeostazy komórkowej w nabłonku plemnikotwórczym. W warunkach fizjologicznych, apoptoza reguluje liczbę plemników na wszystkich etapach ich rozwoju oraz bierze udział w eliminacji komórek uszkodzonych. Z drugiej strony, może być przyczyną rozregulowania systemu kontrolującego spermatogenezę i końcowym efektem różnych patologii. W tym kontekście, szczególnie interesujące jest wyjaśnienie funkcji genów kluczowych dla spermatogenezy, które ulegają ekspresji wyłącznie w gonadzie męskiej. Doktorantka przeprowadziła w pracy analizę wydajności procesu spermatogenezy przy zaburzonej ekspresji genów w dwóch modelach myszy z nokautem genów kodujących białka aktywnie zaangażowane w regulację apoptozy w nabłonku plemnikotwórczym. Warto w tym miejscu podkreślić, że badania nad funkcją genu *Pxt1* i jego współdziałania z genem *Bag6* w kontroli rozwoju męskich komórek płciowych są prowadzone od wielu lat przez zespół prof. UJ dr hab. Pawła

Grzmila, zatem temat niniejszej rozprawy stanowi naturalną kontynuację zainteresowań i osiągnięć promotora pracy. Pracę uważam za bardzo interesującą. Zebrane rezultaty przeprowadzonych doświadczeń mają potencjał publikacyjny. Wyniki analizy fenotypu samców z nokautem genu *Pxt1* zostały już opublikowane w czasopiśmie znajdującym się w bazie Journal Citation Reports, *Reproduction, Fertility and Development*. W pracy tej Doktorantka jest pierwszym autorem.

Charakterystyka formalna i ocena poprawności redakcyjnej rozprawy

Rozprawa została przygotowana w formie monografii naukowej. Praca jest napisana poprawną polszczyzną, chociaż Doktorantka nie uchroniła się przed błędami edytorskimi i tekst rozprawy zawiera dość liczne błędy literowe, interpunkcyjne (szczególnie częstym jest brak spacji). Praca wraz z wykazem piśmiennictwa liczy 96 stron maszynopisu. Zasadniczy trzon rozprawy podzielony jest na pięć rozdziałów tj. wstęp, hipoteza badawcza i cele pracy, materiały i metody, wyniki oraz dyskusja. Zwieńczeniem dysertacji powinny być wnioski, które logicznie wynikają z celów pracy i odpowiadają na postawione pytania i hipotezy, jednak ten rozdział został przez Doktorantkę pominięty. Wniosków wynikających z przeprowadzonych badań trzeba się doszukiwać w dyskusji oraz w streszczeniu pracy. Od młodych adeptów nauki oczekuje się umiejętności analizowania i wyciągania trafnych wniosków, co jednocześnie potwierdza ich predyspozycje i zdolności do samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, dlatego spodziewam się, że Doktorantka na obronie przedstawi wnioski wynikające z przeprowadzonych w pracy badań w formie, jaka wymagana jest w dysertacji doktorskiej. Do błędów formalnych zaliczam również nieprawidłowe umieszczenie tytułów tabel pod tabelami.

Rozprawę uzupełniają wymagane streszczenia w języku polskim i angielskim oraz spisy skrótów, tabel i rycin. Badania będące przedmiotem rozprawy zostały wykonane w ramach realizacji grantu OPUS Narodowego Centrum Nauki (nr projektu 2015/19/B/N24/00574), a na wykorzystanie zwierząt modyfikowanych genetycznie uzyskano wymaganą zgodę Ministra Środowiska na zamknięte użycie GMO (nr zgody 21/2018).

Ocena merytoryczna i metodologiczna rozprawy

Wstęp pracy jest dobrze skonstruowany. Doktorantka dokonała przeglądu literaturowego dotyczącego trudnej problematyki genetycznych uwarunkowań regulacji kontroli procesu spermatogenezy z uwzględnieniem różnych modeli badawczych oraz roli procesu apoptozy na poszczególnych etapach różnicowania i dojrzewania plemników. Końcowy podrozdział części teoretycznej rozprawy Doktorantka słusznie poświęciła badanym genom, *Pxt1* i *Bag6*, dobrze

argumentując cel podjętych badań. Opierając się na wynikach wcześniejszych badań zespołu, w pracy postawiono dwie hipotezy badawcze. Pierwsza z nich zakładała, że u myszy gen *Pxt1*, którego ekspresję wykazano tylko w gonadzie męskiej, koduje białko pro-apoptotyczne zaangażowane w eliminację plemników z uszkodzeniami DNA. Według drugiej hipotezy, białko PXT1 współdziała z anty-apoptotycznym białkiem BAG6 i pełni rolę w kontroli jakości plemników. Aby odpowiedzieć na postawione pytania, Doktorantka z sukcesem wyprowadziła dwie linie myszy, z nokautem genu *Pxt1* oraz podwójnym nokautem genów *Pxt1* i *Bag6*. Badanie fenotypu w obu modelach mysich zostało oparte na: 1/ analizie histologicznej jąder (barwienie hematoksyliną i eozyną); 2/ oznaczeniu parametrów seminologicznych plemników wyizolowanych z ogona najądrzy (badanie liczebności, żywotności, morfologii plemników, analiza parametrów ruchliwości plemników za pomocą systemu komputerowo wspomaganą analizy nasienia, badanie integralności błony witki plemników w funkcjonalnym teście hipoosmotycznym, ocena stopnia uszkodzenia chromatyny plemników w teście Sperm Chromatin Structure Assay – SCSA z detekcją w cytometrze przepływowym) oraz 3/ badaniu płodności w teście konkurencji. Uważam, że zaplanowane badania zostały przeprowadzone rzeczowo, przy zastosowaniu właściwych metod badawczych, z uwzględnieniem odpowiednich kontroli, co wskazuje na dobre opanowanie warsztatu badawczego przez Doktorantkę. Sposób prezentacji uzyskanych danych oraz ich jakość również nie budzą zastrzeżeń. Mam dwie drobne uwagi do rozdziału z wynikami badań. Pierwsza dotyczy podpisów pod rycinami 9 oraz 18. Na obu wykresach przedstawiono wyniki dla liczebności plemników, żywotności plemników, odsetka plemników o prawidłowej morfologii główki oraz plemników o prawidłowej integralności błony witki czyli wyniki parametrów seminologicznych plemników, a nie, jak podano, parametrów morfologicznych. Uwaga ta dotyczy również tytułu podrozdziału 4.1.4. Poza tym uważam, że ryciny 11 i 12 z przykładowym histogramem i cytogramem dot-plot, na których przedstawiono schemat analizy zaburzeń integralności DNA plemników w teście SCSA, powinny znaleźć się w rozdziale Materiały i Metody.

Rozprawę kończy ciekawie poprowadzona dyskusja, w której Doktorantka bardzo skrupulatnie omawia wyniki badań własnych w oparciu o dane innych autorów, szukając odpowiedzi na postawione pytania, tym bardziej, że analiza płodności i jakości nasienia myszy z podwójnym nokautem genetycznym przyniosła zaskakujące rezultaty. Doceniam krytyczne podejście do wyników własnych obserwacji, w tym m. in. do znaczenia biologicznego uzyskanych w badaniach istotności statystycznych. Uważam, że piśmiennictwo zostało trafnie dobrane i poprawnie zacytowane.

Dodatkowe pytania i komentarze

1. W interpretacji wyników oceny stopnia integralności chromatyny plemników należy wziąć również pod uwagę, że niektóre uszkodzenia DNA występują w plemniku naturalnie i mogą zostać pominięte w rutynowych technikach stosowanych do oceny indeksu fragmentacji DNA.
2. Na wysoką integralność chromatyny plemnika składa się jego prawidłowa stabilność, brak fragmentacji DNA i silna kondensacja. W rozprawie przedstawiono wyniki testu SCSA, jednego z kilku testów rekomendowanych do badania uszkodzeń chromatyny/DNA w plemnikach. Pozwala on na identyfikację dwóch subpopulacji komórek tj. plemników z uszkodzonym DNA (indeks DFI) oraz plemników z niedojrzałą chromatyną (indeks HDS). Jest to jednak test pośredni, który służy do oceny wrażliwości plemnikowego DNA na kwaśną denaturację. W kontekście proponowanego pro-apoptotycznego mechanizmu współdziałania białek kodowanych przez analizowane geny, ciekawe mogłyby okazać się wyniki barwienia TUNEL, które pozwala na bezpośredni pomiar fragmentacji DNA w komórkach, z dodatkową możliwością wyodrębnienia populacji apoptotycznej i nekrotycznej. Czy przeprowadzono również takie analizy? Pytanie to związane jest z tym, że Doktorantka dysponuje większym panelem technik do analizy integralności chromatyny plemników tj. test z wykorzystaniem kwaśnego roztworu błękitu aniliny do oceny zaburzeń stabilności i kondensacji plemników czy też test z chromomycyną A3 do oceny zaburzeń protaminacji chromatyny plemników, a wyniki tych analiz wykazała w publikacji, w której opublikowano część rezultatów badań prezentowanych w rozprawie doktorskiej.
3. Słaba „jakość” DNA jest główną cechą wadliwych plemników i wiąże się z obniżoną zdolnością plemników do penetracji komórki jajowej, zwiększoną częstością poronień i zwiększonym ryzykiem chorób u potomstwa. W myśl wolnorodnikowej teorii kontrolowanej apoptozy w plemnikach, za główną przyczynę zaburzeń integralności plemnikowego DNA uważa się stres oksydacyjny. W pracy zabrakło mi analizy markera/ów procesów oksydacyjnych w plemnikach.
4. Jednym z ważnych i interesujących aspektów molekularnego podłoża złożonej biologii spermatogenezy są mechanizmy związane z epigenetyczną kontrolą ekspresji genów regulujących ten proces, o potencjalnie szkodliwym wpływie na sukces reprodukcyjny. Czy w kontekście przyszłych badań planowane są takie badania?

Podsumowanie i wniosek końcowy

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Bernadetty Pawlickiej jest oparta na dobrze zaplanowanym i prawidłowo zrealizowanym projekcie naukowo-badawczym. Wybór tematu jest bardzo aktualny, a uzyskane wyniki wskazują na kierunek, ale również potrzebę przeprowadzenia dalszych badań w celu wyjaśnienia molekularnego mechanizmu interakcji białek PXT1 i BAG3 w kontroli spermatogenezy oraz jakości i potencjału zapładniającego gamet męskich. W związku z powyższym stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Bernadetty Pawlickiej spełnia wymagania określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65 z 2003 r., poz. 595, z późn. zm.). Wnoszę zatem do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Bernadetty Pawlickiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w *dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne*.

Monika Frązek