



Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin

Kierownik: prof. dr hab. Barbara Wiszniewska

tel. + 48 91 466 16 77/78, fax + 48 91 466 16 77

e-mail: kzhe@pum.edu.pl

Prof. dr hab. Barbara Wiszniewska
Kierownik Katedry i Zakładu Histologii i Embriologii
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Recenzja

**rozprawy doktorskiej mgr Bernadetty Pawlickiej
pt. „Określenie funkcji genu *Pxt1* i jego współdziałania z genem *Bag6*
w kontroli jakości plemników”,**

**w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk ścisłych
i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne**

1. Wartość naukowa rozprawy

a. Oryginalność badań

Rozprawa doktorska Pani mgr Bernadetty Pawlickiej wpisuje się w tematykę badań Pracowni Genetyki i Ewolucjonizmu Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, kierowanej przez dr hab. Pawła Grzmila, prof. UJ, promotora niniejszej rozprawy. Celem badań zawartych w rozprawie było przeprowadzenie analizy dotyczącej znaczenia oddziaływania proapoptycznego białka PXT1 oraz białka BAG6 w komórkach germinalnych nabłonka plemnikotwórczego gonady myszy.

Nadekspresja genu *Pxt1* jest powodem masowej apoptozy komórek germinalnych, natomiast u myszy z nokautem genu *Bag6* występują zaburzenia spermatogenezy, co prowadzi do całkowitej bezpłodności. W warunkach fizjologicznych, białko BAG6 chroni komórki przed apoptozą, indukowaną przez PXT1. Dla wyjaśnienia współzależności w działaniu tych białek, po raz pierwszy w badaniach wykorzystano samce myszy z jednoczesnym nokautem genów *Pxt1* oraz *Bag6*, które uzyskano poprzez krzyżowanie osobników, z pojedynczym znokautowanym genem. Wcześniej, na potrzeby realizacji założeń hipotezy badawczej, stworzono linię myszy z nokautem genu *Pxt1*. Poddano analizie morfologicznej gonady oraz plemniki wraz z oceną ich ruchliwości i pęknięć chromatyny, określono też zdolność tych samców do konkurowania o samice, w obecności samców myszy kontrolnych, dla ustalenia, czy myszy są płodne. Badania przedstawione w rozprawie doktorskiej są ważne i nowatorskie, zawierają głównie wyniki dotąd niepublikowane i stanowią oryginalne osiągnięcie naukowe.

b. Wartość naukowa

Podstawową funkcją gonady męskiej jest prawidłowe przeprowadzenie procesu spermatogenezy i produkcja morfologicznie dojrzałych plemników. W procesie „najądrzowego dojrzewania plemników”, gamety nabywają niezbędnych kompetencji do zapłodnienia komórki jajowej. Procesy te wymagają bardzo rygorystycznej kontroli hormonalnej oraz humoralnej, regulującej niezbędne mechanizmy molekularne, gwarantujące wytworzenie prawidłowo funkcjonującej gamety, co ma zasadnicze znaczenie dla utrzymania płodności. Apoptoza komórek germinalnych w trakcie spermatogenezy jest procesem fizjologicznym, mającym na celu zapewnienie właściwej liczby komórek germinalnych (ok. 10), którym komórki Sertolego mogą zapewnić warunki do podziałów i różnicowania. Nieprawidłowości w nadzorze tego procesu, prowadzić mogą do niekontrolowanej apoptozy komórek i zaburzenia płodności.

Nadekspresja genu *Pxt1* w komórkach germinalnych jest takim przykładem, natomiast nokaut genu *Bag6* prowadzi do zaburzenia spermatogenezy, braku plemników i bezpłodności. Dlatego uważam, że rozprawa doktorska Pani mgr Bernadetty Pawlickiej, mająca na celu wyjaśnienie mechanizmów molekularnych współdziałania dwóch genów – *Pxt1* i *Bag6* wpisuje się w bardzo aktualną tematykę badań, a przede wszystkim wnosi nową wiedzę, dotyczącą kontroli spermatogenezy u myszy. Wyniki zawarte w rozprawie poszerzają istotnie wiedzę z zakresu andrologii, dotyczącą przyczyn zaburzenia płodności na poziomie genetycznym.

Podkreślić należy, że część wyników dotycząca parametrów plemników myszy z nokautem genu *Pxt1*, została w lipcu b.r. opublikowana w renomowanym czasopiśmie (*Reprod Fertil Dev* 2023 Jul;35(11):589-600; IF 1.900 / 140 pkt MEiN), a Doktorantka jest pierwszym autorem.

2. Wartość merytoryczna rozprawy

Pod względem merytorycznym, rozprawa została przygotowana bardzo starannie i jest poprawna. We wstępie pracy Autorka przedstawia podstawy zaburzenia płodności na poziomie jądra oraz inne, opisuje proces spermatogenezy i regulację molekularną oraz śmierć komórek, a wszystko w oparciu o adekwatną literaturę. Moim zdaniem, rozdział ten jest szczegółowym wprowadzeniem do tematyki badawczej, a informacje zawarte we wstępie stanowiły podstawę do postawienia hipotezy badawczej i celów rozprawy doktorskiej. Na podkreślenie zasługuje fakt, że zostały one szczegółowo zaplanowane i konsekwentnie realizowane, w oparciu o bardzo dobrze dobrany i zaplanowany warsztat badawczy. Uwzględnił on wygenerowanie myszy z nokautem genu *Pxt1*, myszy z podwójnym nokautem genu *Pxt1* oraz genu *Bag6*, a także analizę fenotypu samców z nokautem genu *Bag6*. W kolejnym rozdziale obszernie opisano metodykę badań, począwszy od badań morfologicznych, metod biologii molekularnej (izolacja DNA i RNA, PCR, reakcja odwrotnej transkrypcji, cytometria przepływowa), czy szczegółowa analiza plemników, zgodna z prowadzoną w profesjonalnych laboratoriach seminologicznych. Wskazuje to, że Doktorantka doskonale opanowała nowoczesne techniki, które umożliwią Jej kontynuowanie dalszej pracy badawczej. Rozdział Wyniki, stanowiący znaczną część rozprawy, został opracowany bardzo starannie, a uzyskane efekty badań zostały przedstawione w bardzo czytelny sposób, m. in. w 20 rycinach oraz 8 tabelach, co znacznie ułatwia ich prześledzenie. Wyniki badań zostały poddane wnikliwej analizie statystycznej, z wykorzystaniem właściwie dobranych narzędzi (test Shapiro-Wilka; test U-Manna-Whitneya,

test t-Studenta oraz test chi-kwadrat). Doktorantka udokumentowała, że (i) wszystkie samce myszy z nokautem genu *Pxt1* są płodne, a z określanych parametrów odnotowano plemniki z podwyższonym odsetkiem fragmentacji DNA; (ii) myszy z nokautem genu *Bag6* charakteryzowały się zaburzoną spermatogenezą, brakiem plemników w świetle kanalików nasiennych i w najądrzu; (iii) natomiast myszy z nokautem genów *Pxt1* i *Bag6* były płodne. Wyniki badań wskazują zatem, że muszą funkcjonować odrębne, nieznanne jeszcze mechanizmy molekularne, które mogą pełnić nadzór nad usuwaniem plemników z uszkodzeniami DNA, a podwójny nokaut genów istotnych dla rozwoju i różnicowania linii germinalnej, w nieznanym jeszcze sposób jest w stanie uruchomić mechanizmy kompensacyjne, pozwalające utrzymać płodność.

Uzyskane wyniki badań zostały umiejętnie przedyskutowane, z wykorzystaniem łaściwie dobranej literatury i są wyczerpujące. Należy podkreślić, że mgr Bernadetta Pawlicka wykazała się dużą umiejętnością w pracy laboratoryjnej, łącząc prace nad genotypowaniem i tworzeniem nowych linii samców mysich z oceną histo-patologiczną gonad, badaniem parametrów morfologicznych plemników i ich DNA, a także kontrolą płodności zwierząt. Oceniana rozprawa doktorska wnosi istotny wkład w rozwój dyscypliny nauki biologicznej.

3. Poprawność redakcyjna rozprawy

Rozprawa doktorska, o klasycznym układzie dla tego typu prac, liczy 102 strony i obejmuje streszczenie w języku polskim oraz angielskim, wykaz stosowanych skrótów, a następnie rozdziały: (i) Wstęp, (ii) Hipoteza badawcza i cele rozprawy doktorskiej, (iii) Materiały i metody, (iv) Wyniki, (v) Dyskusja, (vi) Bibliografia. Na końcu rozprawy załączono też wykaz 23 rycin oraz 17 tabel, zawartych w pracy. Doktorantka zamieściła również informację, dotyczącą źródła finansowania badań, a także o zaakceptowaniu części wyników do druku. Zabrakło jednak określenia uszczegółowionych celów pracy, a także zwyczajowo zamieszczanego po dyskusji rozdziału, pod tytułem Wnioski. Wyniki badań są dobrze udokumentowane, zawierają wysokiej jakości mikrofotografie, czytelne ryciny i tabele. W tabelach nr 12 i nr 16 parametry ruchliwości plemników samców podane są w mm/sekundę, a amplitudę wychylenia główki plemnika w mm. Wartości tych parametrów określone są w $\mu\text{m/s}$, w przypadku ALH w μm . W podpisach pod tabelami jednostki opisane są prawidłowo, czyli dostosowano je do układu SI. Proponuję, aby w przyszłości stosować jednostki używane w rozprawie, zgodnie z Międzynarodowym Układem Jednostek Miar. Moim zdaniem pozyskanie konstruktów genetycznych z nokautem genu *Pxt1* powinno być opisane w rozdziale Materiały i metody. Muszę też wspomnieć o tym, że rozprawa zawiera bardzo wiele błędów literowych w tekście, natomiast Wykaz Stosowanych Skrótów, nie został przygotowany starannie, bowiem nie wszystkie umieszczone skróty są opisane tylko w języku polskim lub tylko angielskim.

4. Uwagi krytyczne

Rozprawę przedstawioną przez mgr Bernadettę Pawlicką oceniam bardzo wysoko, stąd nie mam uwag krytycznych, a wskazane powyżej niedociągnięcia, w żaden sposób nie umniejszają wartości rozprawy, pod względem merytorycznym i naukowym. Szkoda jednak, że został pominięty tak ważny podrozdział, jak Wnioski. Uzyskane wyniki badań wskazują, że samce myszy z nokautem dwóch badanych genów są płodne, co sugeruje występowanie innych

alternatywnych dróg eliminacji plemników z uszkodzonym DNA oraz utrzymania płodności. Stąd pytania, (i) czy Doktorantka w przyszłości planuje podjąć się próby wyjaśnienia tego niespodziewanego zjawiska?; (ii) czy potomstwo myszy z podwójnym nokautem genów jest również płodne?; (iii) czy dla tych mechanizmów kompensacyjnych może mieć znaczenie fakt, że o ile *Pxt1* wykazuje specyfikę względem ekspresji w gonadzie męskiej, o tyle *Bag6* nie jest tkankowo specyficzny (choć dużo go w gonadzie męskiej)?

5. Ocena końcowa

Rozprawa doktorska mgr Bernadetty Pawlickiej stanowi oryginalne, interesujące i kompleksowe opracowanie, dostarczające nowych informacji dotyczących molekularnego podłoża eliminacji plemników myszy, z uszkodzonym DNA. W czasach, gdy zaburzenia płodności męskiej stają się poważnym problemem cywilizacyjnym, podjęta tematyka jest aktualna i nowatorska, a uzyskane wyniki wzbogacają w znaczący sposób dotychczasową wiedzę z zakresu andrologii. Uzyskane wyniki badań stanowią nie tylko wartość poznawczą, ale przy tak doskonale opanowanym warsztacie badawczym, budują też podstawę do planowania i kontynuowania zapoczątkowanych badań. Badania, które Doktorantka realizowała w kolejnych etapach, były zarówno pracochłonne, jak i czasochłonne, wymagające dużego zaangażowania. Zapewne z tego powodu, Doktorantka opublikowała tylko część przedstawionych wyników w dysertacji.

Ja niżej podpisana stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Bernadetty Pawlickiej spełnia warunki określone w art. 13.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami) i **wnioskuje do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Bernadetty Pawlickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Barbara Hszenievska

Szczecin, 22.08.2023