UNIWERSYTET ROLNICZY
im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt
Katedra Rozrodu, Anatomii
i Genomiki Zwierząt

Prof. dr hab. Monika Bugno-Poniewierska
Katedra Rozrodu, Anatomii i Genomiki Zwierząt
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Kraków 05.06.2023

Recenzja

pracy doktorskiej Pani mgr Marty Kloch pt. „Analiza sekwencji sprzężonych z chromosomem Y gatunku *Bison bonasus*".

Badania dotyczące cytogenetycznej charakterystyki chromosomu Y gatunku *Bison bonasus* w porównaniu do gatunków *Bison bison i Bos taurus*, pozwalają poszerzyć wiedzę na temat chromosomów metafazowych, poprzez wyznaczenie pozycji centromeru, określenie typu chromosomu, jego polimorficznych form a także wyznaczeniu markerów cytogenetycznych, do których należą między innymi prążki uzyskiwane w wyniku barwienia różnicowego chromatyny lub też lokalizacja chromosomowo specyficznych *loci*.

Pani mgr Marta Kloch podjęła się zadania poszerzenia wiedzy w zakresie: (i) określenie lokalizacji wybranych genów w chromosomie Y żubra, (ii) porównanie morfologii tego chromosomu z chromosomami Y bydła domowego oraz bizona amerykańskiego oraz (iii) zidentyfikowanie różnic w morfologii chromosomu Y w obrębie gatunku *Bison bonasus*.

Cel ten realizowała w trzech etapach metodycznych. Pierwszy z nich dotyczył uzyskania sond molekularnych specyficznych do określonych sekwencji chromosomu Y, drugi mapowania wybranych genów w chromosomie żubra, natomiast trzeci - charakterystyki cytogenetycznej oraz zmienności chromosomowej pomiędzy kariotypami gatunków *Bison bonasus, Bison bison oraz Bos taurus*, ze szczególnym uwzględnieniem różnic morfologicznych w chromosomie Y u przedstawicieli gatunku *Bison bonasus*.

Podkreślić należy liczny materiał wykorzystany w pracy, którego wykorzystanie umożliwiło wykonaną po raz pierwszy, tak szczegółową analizę cytogenetyczną chromosomów żubra, ze szczególnym uwzględnieniem zmienności międzyosobniczej chromosomu Y. Realizacja założonych celów wymagała od Doktorantki znajomości technik cytogenetyki klasycznej ale również molekularnej, których złożoność i specyfika wymaga precyzji laboratoryjnej, jak również cierpliwości i wytrwałości podczas żmudnych

niezautomatyzowanych analiz. Badania podjęte przez Doktorantkę wpisują się w kierunek badań szeroko pojętej cytogenetyki i w aspekcie gatunku *Bison bonasus* są nowatorskim opracowaniem o znaczeniu poznawczym.

Charakterystyka pracy

Oceniana praca liczy 131 stron i zawiera podstawowe rozdziały charakterystyczne dla tego typu publikacji: wstęp, przegląd literatury, cel pracy, materiał, metody, wyniki, dyskusje, wnioski oraz bibliografie. W pracy zawarto również streszczenie w języku polskim i angielskim oraz 3 załączniki ze szczegółami dotyczącymi przygotowania sond molekularnych oraz przeprowadzenia techniki FISH i PRINS.

Rozprawa doktorska traktuje w sposób merytorycznie poprawny zagadnienia z zakresu metod cytogenetyki klasycznej i molekularnej stosowanych w analizie kariotypu. Tytuł rozprawy jest adekwatny do jej treści, a cel badań jest jasny i prawidłowo sformułowany.

Wprowadzeniem do pracy jest krótki **Wstęp**, liczący 1 stronę maszynopisu zwięźle opisujący gatunek *Bison bonasus* i problematykę zachowania puli genetycznej tego gatunku, wyjaśniając potrzebę prowadzenia badań i poszerzania wiedzy o żubrach. Rozwinięciem tego rozdziału jest bardzo długi przegląd piśmiennictwa liczący 32 strony. Został on podzielony na podrozdziały, w których Pani mgr Marta Kloch, z wykorzystaniem, właściwie dobranych artykułów naukowych opisała historię badań cytogenetycznych, hodowli komórkowej, wybranych klasycznych technik barwienia chromosomów, analizę chromosomów z wykorzystaniem narzędzi cytogenetyki molekularnej oraz przedstawiła krótką charakterystykę badanych gatunków, czyli żubra, bizona amerykańskiego jak również bydła domowego. W dalszej części tego rozdziału skupiła się na opisie podobieństw i różnic chromosomu Y w rodzinie *Bovidae* oraz przeglądzie badań cytogenetycznych obejmujących gatunki będące przedmiotem dysertacji wykonane przez innych badaczy. Na podkreślenie zasługuje opracowany w formie tabeli wykaz zlokalizowanych w chromosomie Y bydła domowego sekwencji kodujących oraz niekodujących.

Do rozdziału tego mam następujące uwagi:

- we wstępnie (ale również w streszczeniu, przeglądzie literatury) stwierdzenie: „Efekt wąskiego gardła doprowadził do zmniejszenia puli genów, co znajduje również odzwierciedlenie w zmniejszonej różnorodności chromosomów" przez swoją ogólnikowość sugeruje, że zmniejszyła się liczba genów co miało wpływ na zmniejszenie różnorodności chromosomów, co z kolei może być interpretowane jako zmiany w morfologii czy liczbie

chromosomów. Proponowałabym bardziej precyzyjny zapis mówiący o zmniejszonej puli wariantów genów oraz zmniejszeniu polimorfizmu chromosomowego;

- również w tym rozdziale (ale pojawiające się również w dalszej części pracy) można spotkać stwierdzenie „... w całej populacji żubrów występują tylko trzy kopie chromosomu Y" – jest to zbyt duże uproszczenie, zwłaszcza w aspekcie cytogenetyki, w której 3 kopie chromosomu oznaczają aneuplidię. W aspekcie omawianej problematyki proponuję używanie sformułowania „3 linie chromosomu Y"

- w podrozdziale 2.1.3. „Analiza chromosomów – cytogenetyka molekularna, do sposobu uzyskiwania sond molekularnych Doktorantka zalicza poza mikrodysekcją, sortowaniem, klonowaniem w wektorach, czy reakcją PCR również reakcję nick – translacji czy random priming. Te dwie ostatnie, to techniki jedynie znakowania sond a nie ich uzyskiwania.

- również w tym rozdziale w opisie sond stosowanych w diagnostyce cytogenetycznej (klinicznej), zabrakło mi informacji o sondach stosowanych w diagnostyce cytogenetycznej u zwierząt (a takie są wykonywane w kilku laboratoriach na świecie, w tym również w Polsce), zwłaszcza, że przedstawiona do oceny praca dotyczy badań przeprowadzanych na chromosomach zwierzęcych, które z racji braku sond molekularnych na rynku komercyjnym są znacznie utrudnione, czego efekt można również zauważyć w niniejszej dysertacji;

- opis mieszaniny reakcyjnej dla techniki PRINS „... w mieszaninie reakcyjnej znajdują się: nieznakowany starter i znakowane fluorescencyjnie nukleotydy..." jest nieprecyzyjny, gdyż w mieszaninie znajdują się nukleotydy, w tym tylko 1 znakowany fluorescencyjnie, który dodaje się w ściśle określonych proporcjach w stosunku do pozostałych nukleotydów;

- w podrozdziale 2.4. pojawia się wyrażenie „Najczęściej występującymi kopiami chromosomu X (które nie są równomiernie rozproszone w populacji) są kopie pochodzące od 4 samic..." - proponuje przeredagować na: „Najczęściej występującymi liniami chromosomu X (które nie są równomiernie reprezentowane w populacji) są heterosomy pochodzące od 4 samic..."

- w podrozdziale 2.5.1 w opisie prążków C, napisano: „... pod względem prążków C oraz stosując metodę SCE. Stwierdzono wówczas, że nie ma różnicy między chromosomami obu gatunków". Proszę o wyjaśnienie czy metoda SCE jest stosowana do obserwacji polimorfizmu w obrębie lub pomiędzy gatunkami i w jaki sposób metoda ta miała zastosowanie do analizy różnic między chromosomami żubra i bydła.

W rozdziale „**Materiał**" Doktorantka przedstawiła zarówno opisowo jak i tabelarycznie charakterystykę pobranego materiału, z wykazem lokalizacji miejsc pozyskiwania materiału. W tym miejscu jeszcze raz chciałam podkreślić niezmiernie liczebny materiał użyty do badań, który ze względu na specyfikę metodyczną wymagał doskonałej organizacji pracy, ale również dyscypliny w pracach laboratoryjnych.

W rozdziale „**Metody**" mgr Marta Kloch przedstawiła opisowo zastosowane techniki badawcze, dodatkowo przygotowała również 3 załączniki w których szczegółowo opisała wykonywane procedury przygotowania sond molekularnych, przeprowadzenia reakcji FISH oraz reakcji PRINS. Bardzo proszę o uzupełnienie informacji dotyczącej wykonania techniki FISH a dokładnie etapu postępowania z sondą po denaturacji a przed nałożeniem na preparaty. Proszę również o podanie informacji jaki bufor stanowił środowisko w komorze wilgotnej.

W rozdziale pt. „**Wyniki**" Doktorantka przedstawiła, w uporządkowany sposób, na 31 stronach, uzyskane rezultaty. Rozdział ten słusznie został podzielony na 7 podrozdziałów. Taka konstrukcja czyni pracę czytelną, pomimo zamieszczenia dużej liczby rezultatów. Wyniki zestawiono na 33 rycinach obrazujących zdjęcia mikroskopowe, 12 tabelach oraz 12 wykresach. Układ rycin, tabel i wykresów jest przejrzysty i komunikatywny. Na uwagę zasługuje jakość przedstawionych płytek metafazowych, z rozproszonymi chromosomami o wyraźnej morfologii. Jakość ta jest gwarancją rzetelności wykonanych pomiarów. Ryciny 13-25 przedstawiają wyniki dla technik cytogenetyki molekularnej, FISH oraz PRINS. Niestety w tej części doświadczenia nie udało się Doktorantce uzyskać planowanych rezultatów, otrzymując niespecyficzne sygnały lub ich brak. W przypadku przedstawionych wyników reakcji PRINS ze starterami dla genów SRY i PRL, dla których opisano otrzymanie w jądrach interfazowych odpowiednio jeden i dwa sygnały, nie jest możliwa ich weryfikacja na zamieszczonych w pracy zdjęciach, na których te sygnały nie są widoczne. Najprawdopodobniej jest to wynikiem samego wydruku, ale wnoszę tę uwagę z obowiązku funkcji recenzenta. Wyraźne, czytelne sygnały hybrydyzacji sond malujących chromosomy płci przedstawiono na fotografiach 37 i 38.

Wyniki dotyczące pomiarów chromosomów przygotowane na podstawie dokumentacji fotograficznej chromosomów z wybarwionymi prążkami C przeprowadzono i przedstawiono dla parametrów takich jak długość względna chromosomu Y oraz długość rzeczywista chromosomu Y dla trzech analizowanych gatunków oraz odrębnie dla osobników z linii nizinnej i nizinno-kaukaskiej. Dodatkowo Doktorantka wykonała pomiar powierzchni prążka C w chromosomie Y oraz określiła poziom obszaru heterochromatyny zajmowany w

chromosomie Y. Wyniki tej części dysertacji uważam za pionierskie i niezmiernie cenne dla poszerzenia wiedzy o morfologii i polimorfizmie chromosomu Y w obrębie gatunku *Bison bonasus* jak również dla badań porównawczych do gatunków *Bison bison* i *Bos taurus* w aspekcie wymienionego heterosomu.

W rozdziale **Dyskusja** Doktorantka podjęła się skonfrontowania otrzymanych wyników z rezultatami innych badaczy. Rozdział ten liczy jedynie 8 stron i omawia początkowo problem uzyskiwania dobrej jakości chromosomów metafazowych po hodowlach z wykorzystaniem krwi pobranej od osobników poddanych środkom anestetycznym, by następnie przedyskutować lokalizację prążka C na chromosomie Y, uwzględniając różnice morfologiczne tego heterosomu w rodzinie *Bovidae*. Następnie Autorka rozważa przyczyny niepowodzenia w części pracy dotyczącej lokalizacji wybranych genów w chromosomie Y żubra. Zalicza do nich: długość sondy, stężenie sondy, dodatek COT-DNA, pozostałość cytoplazmy, temperaturę hybrydyzacji czy zbyt restrykcyjne warunki przy serii płukań. Zabrakło mi w tym miejscu zwrócenia uwagi na etap denaturacji sondy, jego temperatury i czasu, jak również postępowania z sondą po denaturacji (przełożenie na lód czy preamplifikacja w cieplarce). Są to dwa bardzo ważne punkty podczas techniki FISH, które znacząco wpływają na uzyskiwane rezultaty, zwłaszcza w aspekcie sond niekomercyjnych.

Ponieważ wyniki dotyczące porównania morfologii chromosomu Y w obrębie trzech gatunków rodziny *Bovidae* oraz wariantów polimorficznych tego chromosomu w obrębie gatunku *Bison bonasus*, były pionierskie, autorka przedyskutowała je z wynikami badań przeprowadzanych dla innych gatunków. Tę część dyskusji uważam za ciekawą i przeprowadzoną prawidłowo.

W świetle mojej wiedzy ważne pozycje piśmiennictwa nie zostały pominięte, a użycie wszystkich cytowań było uzasadnione. Oceniając treść merytoryczną tego rozdziału stwierdzam, że Pani mgr Marta Kloch wykazała się dobrą orientacją w piśmiennictwie naukowym dotyczącym problematyki badań oraz umiejętnością wykorzystania jej przy dyskusji własnych rezultatów.

Rozprawę kończy rozdział **„Wnioski"** w którym Doktorantka przedstawiła aż 14 sformułowań. W mojej opinii, jedynie dwa pierwsze punkty można uznać za wnioski, pozostałe są wynikami. Uwaga ta, jak i wszelkie uwagi zawarte w recenzji powinny pomóc w przeredagowaniu wyszczególnionych fragmentów tekstu przy przygotowywaniu pracy do publikacji.

Moja ogólna ocena wartości merytorycznej pracy jest pozytywna. Uzasadniając tę ocenę podkreślić należy oryginalność badań, ich pracochłonność oraz fakt, że praca wnosi nowe wartości poznawcze.

Wniosek końcowy

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Marty Kloch pt.: „Analiza sekwencji sprzężonych z chromosomem Y gatunku *Bison bonasus*" spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 *Ustawy* z dn. 14. marca 2003 r. *o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki* (Dz. U. Nr 65, poz. 595, ze zm. w Dz. U. z 2005 r. Nr 164, poz. 1365). Dlatego też składam do Wysokiej Rady Wydziału Nauk o Zwierzętach SGGW, wniosek o dopuszczenie Pani mgr Marty Kloch do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Monika Bugno-Poniewierska