



wp. 23.04.2018 l-c

ADAM MICKIEWICZ UNIVERSITY IN POZNAŃ

Faculty of Biology
Institute of Anthropology

Izabela Makałowska, prof. dr hab.
Zakład Genomiki Zintegrowanej
Instytut Antropologii
Wydział Biologii
Uniwersytet im A. Mickiewicza w Poznaniu

Poznań, 15.04.2017

**RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ PANI MGR MAGDALENY MAŁACHOWICZ
POD TYTUŁEM „TRANSKRYPTOMIKA PORÓWNAWCZA WYBRANYCH GATUNKÓW
ZWIERZĄT MORSKICH”**

Rozprawa doktorska przedstawiona przez Panią Magdalenę Małachowicz wykonana została pod kierunkiem prof. dr hab. Romana Wenne w Zakładzie Genetyki i Biotechnologii Morskiej Instytutu Oceanologii PAN. Przedłożona praca składa się z obszernego streszczenia oraz trzech artykułów naukowych. Do pracy dołączone są oświadczenia współautorów publikacji określające ich udział w poszczególnych publikacjach. Przedstawiona rozprawa poświęcona jest różnorodności genetycznej wybranych gatunków zwierząt morskich odgrywających istotną rolę w zaspokajaniu światowego zapotrzebowania na żywność: dorsza atlantyckiego, troci wędrownej i małży z rodzaju *Mytilus*. W pracy wykorzystane zostały dane transkryptomyczne, które zostały uzyskane za pomocą techniki pirosekwencjonowania i następnie poddane analizie bioinformatycznej.

W streszczeniu doktorantka w syntetyczny sposób przedstawiła najnowsze technologie sekwencjonowania, podstawowy schemat analizy danych wykorzystany w pracy doktorskiej oraz możliwości wykorzystania danych transkryptomicznych w badaniach nad zmiennością gatunków. W dalszej części streszczenia doktorantka opisała najważniejsze uzyskane wyniki.

Pierwsza z publikacji stanowiących rozprawę doktorską „Transcriptome analysis of gill tissue of Atlantic cod *Gadus morhua* L. from the Baltic Sea” ukazała się w czasopiśmie *Marine Genomics*,

ul. Umultowska 89, 61-614 Poznań, Poland
tel. +48 61 829 57 30, + 48 61 829 58 35
anthro@amu.edu.pl

www.biologia.amu.edu.pl

którego aktualny współczynnik oddziaływania wynosi 1,94. W pracy tej doktorantka wykonała analizy bioinformatyczne, poczynając od składania transkryptomu *de novo*, poprzez analizę funkcjonalną i porównanie z transkryptomem dorsza pochodzącego z Atlantyku. Analiza transkryptomu wykonana została w standardowy sposób z wykorzystaniem istniejących narzędzi. W wyniku składania transkryptomu doktorantka uzyskała 14 029 kontigów reprezentujących 13 585 genów. Wszystkie kontigi zostały scharakteryzowane pod względem funkcjonalnym przy pomocy terminów GO. Ostatnim etapem pracy było porównanie transkryptomu dorsza pochodzącego z Bałtyku z dorszem wyłowionym z Oceanu Atlantyckiego. Doktorantka wykazała, że 1,44% transkryptów różniło się w istotny sposób. Bardzo szkoda, że doktorantka nie pokusiła się o dalsze analizy porównawcze. Ten aspekt wydaje się być najciekawszym elementem pracy, która w obecnej formie ma charakter bardzo opisowy. Ciekawym byłoby, które konkretnie geny wykazują różnice, w jakim stopniu i jakie to może mieć znaczenie funkcjonalne.

Druga praca będąca częścią rozprawy doktorskiej, „De novo assembly of the sea trout (*Salmo trutta m. Trutta*) skin transcriptome to identify genes involved in the immune response and epidermal mucus secretion” ukazała się w czasopiśmie naukowym *PLoS One*. Głównym celem pracy, oprócz standardowej analizy transkryptomu, była identyfikacja i analiza genów zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną oraz w wydzielanie śluzu u troci wędrownej. Aspekt ten jest o tyle ważny, że połowy troci wędrownej w ostatnich latach bardzo spadły, a wymieranie z powodu różnych chorób, obok wzrastającego zanieczyszczenia wód, uważa się za jedną z głównych tego przyczyn. Identyfikacja genów związanych z procesami odpornościowymi i budowaniem bariery immunologicznej jest zatem jednym z zasadniczych elementów badań związanych z biologią tego gatunku i przyczynami zmniejszania się jego populacji. Podobnie jak we wcześniejszej pracy transkryptom, w tym przypadku transkryptom skóry, został zsekwencjonowany wykorzystując metodę pirosekwencjonowania, a następnie wykonana została standardowa analiza bioinformatyczna (kontrola jakości, składanie *de novo*). W kolejnym kroku doktorantka przeprowadziła szczegółową analizę funkcjonalną przypisując terminy GO do otrzymanych kontigów oraz analizując szlaki metaboliczne, w których biorą udział produkty zidentyfikowanych genów. Szczególna uwaga została w pracy zwrócona na kontigi wykazujące podobieństwo do genów mucyn będących istotnym składnikiem śluzu i odgrywających istotną rolę w mechanizmach obronnych i interakcjach patogen-gospodarz oraz do genów kodujących białka związane z odpowiedzią immunologiczną. W transkryptomie troci doktorantka zidentyfikowała i szczegółowo scharakteryzowała 8 rodzajów mucyn oraz 140 genów zaangażowanych w ich biosyntezę. Dodatkowo, zidentyfikowanych zostało 1119 potencjalnych polimorfizmów SSR (Simple Sequence Repeats). Ten ostatni krok jest nieco intrygujący, gdyż biorąc pod uwagę kontekst i cel pracy, nie widzę

uzasadnienia takiej analizy. Informacja o SSR nie jest przez doktorantkę wykorzystywana w którymkolwiek z etapów analiz.

Trzecia z prac, „Mantle transcriptome sequencing of *Mytilus spp.* and identification of putative biomineralization genes” ukazała się w czasopiśmie *PeerJ* (współczynnik oddziaływania 2,118). W pracy tej analizie poddane zostały transkryptomy płaszcza czterech taksonów małży z różnych lokalizacji geograficznych. Po złożeniu transkryptomów i podstawowej adnotacji funkcjonalnej wykonanej za pomocą programów BLAST i Blast2GO, doktorantka zidentyfikowała transkrypty kodujące białka potencjalnie związane z biomineralizacją i melanogenezą oraz z odpowiedzią na zakwaszenie wód. Doktorantka przeprowadziła także analizę filogenetyczną sekwencji genów związanych z odpowiedzią na zakwaszenie wód oraz związanych z biomineralizacją. Analiza ta nie dała, jak można wnioskować z pracy, jednoznacznych odpowiedzi dotyczących zarówno historii ewolucyjnej badanych genów jak i relacji pomiędzy gatunkami z gromady małże. Może to wynikać zarówno z charakteru danych, pewnych braków jak i skomplikowanej historii ewolucyjnej. W pracy dodatkowo zidentyfikowane zostały markery SSR i SNP i tutaj, podobnie jak w przypadku wcześniej omawianej pracy, nie widzę uzasadnienia dla tych analiz skoro ich wyniki nie miały znaczenia dla przeprowadzanych analiz porównawczych i filogenetycznych.

We wszystkich trzech pracach stanowiących rozprawę doktorską doktorantka jest pierwszą autorką, a jak wynika z opisu udziału poszczególnych autorów, wkład doktorantki jest bardzo istotny we wszystkich z nich. Podstawą prac były analizy bioinformatyczne i ewolucyjne wykonane głównie przez doktorantkę. Przeprowadzone analizy zostały należycie wykonane w oparciu o standardowe narzędzia. Pracując nad różnymi aspektami analizy transkryptomów, doktorantka wykazała się zarówno znajomością tychże narzędzi jak i umiejętnością poprawnego ich wykorzystania. Warto zaznaczyć, że zakres wykonywanych analiz wyraźnie pogłębia się w kolejnych pracach co świadczy o naukowym dojrzeniu doktorantki i coraz lepszym opanowaniu warsztatu badawczego. O ile w pierwszej z prac, opublikowanej w 2015 roku, przeprowadzona została jedynie podstawowa analiza bioinformatyczna, o tyle w ostatniej doktorantka, oprócz standardowej analizy związanej ze składaniem i adnotacją funkcjonalną transkryptomów, wykonała także wieloaspektową analizę porównawczą i ewolucyjną.

Nie mam merytorycznych zastrzeżeń odnośnie wykonanych analiz, wykorzystanych narzędzi czy też interpretacji wyników. Mam jednak uwagi dotyczące dwóch problemów, które być może wynikają z pewnej niezręczności językowej. Pierwsza kwestia dotyczy przypisywania transkryptom terminów GO. W artykule, który ukazał się w czasopiśmie *Marine Genomics* rysunek 3c podpisany jest „Within these genes, 56,63% belonged to molecular function, 28,06% to biological proces and 15,61% cellular

component". Nie jestem przekonana czy określenie „belonged to” jest tutaj prawidłowe. Deskryptory opisujące funkcje molekularne, lokalizację i proces biologiczny nie są rozłączne i geny nie są przypisywane do jednej z tych trzech grup. Zasadniczo każdy z genów może być i bardzo często jest opisany terminami z wszystkich trzech kategorii. Dlatego też, poprawnie byłoby „Within these genes, 56,63% had assigned molecular function, 28,06% biological proces and 15,61% cellular component”. Podobny problem pojawia się w pozostałych dwóch publikacjach. Drugim istotnym problemem jest używanie określenia „homologia” równoznacznie z „podobieństwem”. Jest to błędne używanie tego terminu. Homologia jest wartością binarną i określa relacje ewolucyjne, a dokładniej to, czy geny mają wspólne pochodzenie czy też nie. Niepoprawnym jest zatem stwierdzenie w pracy opublikowanej w *PLOS One*, że „47,27% [contigs] had highly and moderately significant homology” lub „The BLASTX results identified numerous contigs as showing significant homology to fish mucin gene.” Podobnie niezrozumiałe jest stwierdzenie w pracy opublikowanej w czasopiśmie *Marine Genomics* „Of the 14,029 contigs, 100% homologous transcripts (13 585 genes) were identified using BLASTn ...”. Homologii nie można stopniować lub określać wartościami procentowymi, homologia albo jest, albo jej nie ma.

Podsumowując, podjęta przez doktorantkę tematyka jest istotna, a otrzymane wyniki z pewnością przyczyniają się do zrozumienia zróżnicowania genetycznego badanych gatunków i stanowią doskonałą bazę do dalszych badań nad różnorodnością organizmów wodnych. Wyniki uzyskane przez doktorantkę opublikowane zostały w dobrych czasopismach naukowych, a ich znaczenie dla badań związanych z biologią i przystosowaniem do środowiska organizmów morskich trudno zakwestionować. Wszystkie prace cechuje staranność i rzetelność przeprowadzonych badań. Wskazują one także na duże zaangażowanie doktorantki i spore umiejętności w obszarze badań bioinformatycznych. Dlatego też stwierdzam, że praca ta spełnia wszystkie ustawowe i zwyczajowe wymogi, i stawiam wniosek o dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu.

Paulina Kelnuska