

Jastrzębiec 05 Stycznia 2024r.

Prof. dr hab. Mariusz Pierzchała
Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt
Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu

Recenzja pracy doktorskiej mgr Bartosza Czecha

pt. “ **The application of bioinformatics tools for the analysis of the genetic background of heat stress resistance in cattle**

Wykorzystanie narzędzi bioinformatycznych do analizy genetycznego podłoża odporności na stres cieplny na przykładzie bydła”

pod kierunkiem Promotor: **Prof. dr hab. Joanna Szyda**

Katedra Genetyki

Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Promotor pomocniczy: **Prof. Gustavo de los Campos,**

Katedra Epidemiologii i Biostatystyki

Uniwersytet Stanowy Michigan

Ocena formalna

Przedstawiona do recenzji dysertacja, Pana mgr Bartosza Czecha obejmuje cykl publikacji opatrzony wspólnym tytułem „The application of bioinformatics tools for the analysis of the genetic background of heat stress resistance in cattle”.

W przestawionym cyklu artykułów znajdują się trzy oryginalne prace. Dwie opublikowane w recenzowanych czasopismach indeksowanych na liście JCR, w tym w BMC Microbiology (Czech, B., Szyda, J., Wang, K., Luo, H., & Wang, Y. (2022). Fecal microbiota and their association with heat stress in Bos taurus. In BMC Microbiology (Vol. 22, Issue 1, IF 4.465 roku publikacji 2022), Frontiers in Microbiology (**Czech, B.**, Wang, Y., Wang, K., Luo, H., Hu, L., & Szyda, J. (2022). Host transcriptome and microbiome interactions in Holstein cattle under heat stress condition. In Frontiers in Microbiology (Vol. 13, IF 6.064 rok publikacji 2022) oraz trzecia w Cold Spring Harbor Laboratory opublikowana jako preprint w trakcie recenzji (**Czech, B.**, Wang, Y., & Szyda, J. (2023). Genome-wide association study of heat stress response in Bos taurus. Cold Spring Harbor Laboratory). Doktorant jest pierwszym autorem we wszystkich pracach co dowodzi wiodącego udziału w opracowaniu w/w publikacji.

Załączony do wykazu publikacji autoreferat obejmuje streszczenie w języku polskim oraz angielskim; Wstęp; Cele badawcze - zdefiniowane dla każdej publikacji, Podsumowanie, Piśmiennictwo.

Ocena merytoryczna

1. *Tematyka badań i ich znaczenie*

Przedmiotem rozprawy doktorskiej było oddziaływanie stresu cieplnego na organizm zwierząt w oparciu o wielkoskalowe badania genomu, transkryptomu i mikrobiomu krów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej. Dokładna charakterystyka zmian zachodzących w organizmie zwierząt pod wpływem stresu cieplnego, nie jest w pełni poznana. Jednakże bez wątpliwości zdolności adaptacyjne do warunków środowiskowych, w tym temperatury otoczenia są w istotnym stopniu determinowane genetycznie, tak więc są specyficzne gatunkowo, rasowo jak też w pewnym stopniu zależne od zmienności osobniczej.

Zdolność aklimatyzacji organizmu zwierząt do wyższej temperatury otoczenia może być związana nie tylko z genotypem gospodarza, ale też z mikrobiotą jelitową oraz wzajemną interakcją z organizmem gospodarza. Podjęte przez Autora kompleksowe badania molekularne z wykorzystaniem nowoczesnych metod omicznych i zaawansowanych analiz bioinformatycznych pozwoliły szerzej opisać zakres zmian w organizmie zwierząt jakie zachodzą pod wpływem stresu cieplnego, oraz dokładniej zdefiniować potencjalne główne czynniki, istotne dla niwelowania niekorzystnych skutków stresu cieplnego.

Nie ulega wątpliwości, że intensywna produkcja zwierzęca sprzyja zwiększeniu prawdopodobieństwa narażenia zwierząt na niekorzystne oddziaływanie stresu cieplnego.

Poznanie takich czynników może być pomocne w odpowiedniej selekcji zwierząt oraz lepszemu opracowaniu system żywienia i składu paszy dla poprawy dobrostanu i produktywności zwierząt w niekorzystnych warunkach klimatycznych.

Optymalizacja systemów utrzymania zwierząt jest również kluczowym elementem dla produkcji bezpiecznej żywności w ramach rozwoju zrównoważonego rolnictwa. Dlatego podjęty temat ma nie tylko ważny walor poznawczy, ale też wymierny potencjał aplikacyjny.

2. *Oryginalność tematyki i wartość poznawcza pracy*

Prezentowana praca doktorska podejmuje oryginalną tematykę dotyczącą jak już wspomniano ważnego zagadnienia mającego istotny związek z dobrostanem i produktywnością zwierząt. Wartość poznawcza podjętych badań wynika wprost z braku pełnej wiedzy opisującej wskaźniki/biomarkery stresu cieplnego oraz braku dokładnej charakterystyki czynników, które stres ten mogą niwelować. Zostało to szczegółowo uzasadnione we wstępie i poparte licznie cytowanym piśmiennictwem również w dyskusji pracy.

3. Zdefiniowanie celów/ hipotez badawczych

Doktorant prawidłowo nakreślił cele badawcze oraz szczegółowo opisał zastosowaną metodologię badań prezentowanych w załączonych publikacjach.

Ogólnym celem prezentowanej przez Doktoranta rozprawy było poznanie wzajemnych zależności między organizmem gospodarza a jego mikrobiomem, w aspekcie tolerancji i odporności na stres cieplny.

Ponadto zostały wyróżnione cztery szczegółowe cele badawcze, które obejmowały:

- identyfikację i charakterystykę mikrobioty jelitowej związanej ze stresem cieplnym;
- identyfikację genów ulegających zróżnicowanej ekspresji pod wpływem stresu cieplnego
- badanie dynamiki interakcji między transkryptomem gospodarza (bydło) a mikrobiomem jelitowym w warunkach stresu cieplnego
- identyfikację związków między zmiennością genetyczną a poziomem reakcji na stres cieplny.

Istotnym elementem w badaniach które podjął Doktorant było opracowanie i wdrożenie zaawansowanych metod bioinformatycznych, co może w przyszłości służyć jako instrumentalne narzędzie w skomplikowanych analizach mechanizmów molekularnych jakie są identyfikowane na poziomie genomu, transkryptomu i mikrobiomu.

4. Zakres i metody badań

Zakres i metody badań nie budzą zastrzeżeń od strony warsztatowej, są adekwatne do podjętych celów oraz weryfikacji założonych hipotez badawczych.

W pierwszej pracy materiał badawczy objął 136 próbek kału od 136 chińskich krów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej, zebrane w trzech kolejnych latach: 2017, 2018 i 2019. Doktorant przeanalizował kompleksowo jakościowo i ilościowo mikrobiotę za pomocą sekwencjonowania genu 16S rRNA. Następnie stosując odpowiednie modelowanie statystyczne wykazał istotnie zmiany składu mikrobiomu w relacji do fizjologicznych wskaźników stresu cieplnego takich jak: temperatura w mierzona w odbytnicy, aktywność

oddechowa czy ilość produkowanej śliny. Autor wykazał m.in., że wzrost temperatury wiązał się ze zmniejszoną liczebnością większości zidentyfikowanych szczepów bakterii. Słusznie zauważa, że część identyfikowanych zmian może jednak wynikać ze zmiany diety.

Stąd rodzi się pytanie dotyczące jakościowego składu diety w różnych okresach pobierania prób? Inne pytanie to jak szybko zachodzą zmiany mikrobiomu jelitowego, po jakim czasie możemy je zaobserwować, od zmiany diety lub zmiany temperatury otoczenia? Odpowiedź na te pytania ma kluczowe znaczenie dla ewentualnej oceny wykorzystania zmian mikrobioty jako sygnalizatora wystąpienia stresu cieplnego u krów. Doktorant stwierdził też brak istotnego nakładania się trzech fizjologicznych wskaźników stresu cieplnego w odniesieniu do zmian jakości mikrobioty. Stąd pytanie co wg Autora może być powodem tak zróżnicowanych obserwacji? Jak jest kolejność identyfikowanych reakcji organizmu, na stres cieplny?. Autor stwierdza, że analiza dynamiki mikrobiomu bezpośrednio w stadzie produkcyjnym może określić "fenotyp" stresu cieplnego. Tym niemniej słusznie zauważa, że złożoność reakcji wymaga korekt dotyczących efektów genetycznych i środowiskowych, które mogą mieć wpływ na wyniki wskaźników stresu cieplnego. Dlatego przed faktycznym modelowaniem stresu cieplnego zdecydował się użyć wartości hodowlanych jako pseudofenotypów. Jest to interesujące i w dużym stopniu nowatorskie podejście do badania przyczyn zmian mikrobiomu jelitowego u zwierząt. Jednakże interesującym byłaby również weryfikacja, czy oprócz liniowej zależności nie występowała korelacja nieliniowa między mierzonymi wskaźnikami jak i zmianami jakości i liczebności różnych rodzajów bakterii mikrobiomu.

W drugiej pracy głównym założonym celem było kompleksowe zbadanie wpływu stresu cieplnego na zmiany transkryptomu białych krwinek krwi, z wykorzystaniem danych sekwencyjnych mRNA, oraz związku tych zmian wynikami analiz mikrobioty jelitowej. Doktorant określił istotność poziomu interakcji między profilem ekspresji genów leukocytów krwi gospodarza a zmianami liczebności określonych rodzajów bakterii w mikrobiomie jelitowym odpowiedzi na stres cieplny. Przeprowadzając wieloetapową kompleksową analizę bioinformatyczną i statystyczną obejmującą grupowanie i klasyfikację odczytów sekwencji 16S rRNA, mapowanie transkryptów do genomu referencyjnego bydła oraz kwantyfikację ich ekspresji wykazał różnicową ekspresję genów, którą następnie wykorzystał do identyfikacji stopnia wzbogacenia zestawu genów w zdefiniowanych szlakach metabolicznych i procesach biologicznych odpowiednich baz bioinformatycznych. Uzyskane wyniki przedstawione w pracy potwierdziły istotną rolę mikrobiomu jelitowego w regulacji ekspresji genów gospodarza. Weryfikacja bioinformatyczna wykazała związek zmian ekspresji genów z

szeregiem szlaków metabolicznych i procesów biologicznych, wskazując potencjalne kluczowe geny jako biomarkery odpowiedzi na stres cieplny u bydła. Na podkreślenie nowatorskiego charakteru pracy zasługuje fakt, że przedstawiony w rozprawie eksperyment jest jednym z pierwszych tego typu badań oddziaływania stresu cieplnego na organizm krowy, w których połączono dane wielkoskalowe dotyczące transkryptomu leukocytarnego organizmu gospodarza z jakościową i ilościową oceną mikrobioty jelitowej. Uzyskane wyniki odpowiedzi krów na stres cieplny zarówno na poziomie ekspresji genów, oraz interakcji ekspresji genów ze zmianami mikrobioty dowodzą, że czynniki środowiskowe oddziałują na organizm w sposób bardzo złożony. Wykazanie roli mikrobiomu jelitowego w regulacji ekspresji genów komórek układu odpornościowego (leukocytów) jest interesującym i ważnym wynikiem, tym niemniej pożądanym byłoby rozdzielenie frakcji komórkowych leukocytów przed analizą ekspresji genów. Kluczowym ale też trudnym do realizacji byłoby też oddzielenie bezpośredniego wpływu stresu cieplnego na aktywację układu odpornościowego, od pośredniego wpływu poprzez zmiany jakości i ilości rodzajów bakterii bytujących w przewodzie pokarmowym. Praca jest niezaprzeczalnie nowatorska zarówno tematycznie jak i metodologicznie, zwłaszcza w części bioinformatycznej. Na pewno też daje asumpt do dalszej dogłębnej eksploracji tematu w celu kompleksowego wyjaśnienia złożonego procesu aktywacji różnych szlaków biologicznych w odpowiedzi na stres cieplny.

W trzeciej ostatniej pracy doktorant przeprowadził badania ukierunkowane na identyfikację zmienności genetycznego podłoża zróżnicowanej odpowiedzi na stres cieplny. Przedstawione badania dopełniają obrazu wcześniejszych badań związanych z tematem co i jak warunkuje odpowiedź organizmu na stres cieplny. Załączona praca jest opublikowana jako preprint, co oznacza, że jest w trakcie oceny merytorycznej przez recenzentów wydawniczych, tym niemniej należy stwierdzić, że zawiera nowe wartościowe wyniki, które są cennym uzupełnieniem danych niezbędnych w zintegrowanej analizie omiczej. Doktorant wykorzystując narzędzia biologii molekularnej przeprowadził analizy asocjacyjne obejmujące cały genom (GWAS), w oparciu o ponad 100 tys. polimorfizmów typu SNP. Analizy statystyczne pozwoliły wskazać istotny związek wielu polimorfizmów z odpowiedzią na stres cieplny. Doktorant analizując zmienność DNA wyrażoną przez polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNP) od 68 krów identyfikowanych za pomocą mikromacierzy oligonukleotydowych, wykazał istotny związek 17 SNP rozmieszczonych w trzech chromosomach ze stresem cieplnym. Interesującym jest to to, że wskazane polimorfizmy SNP są powiązane z genami uczestniczącymi w szlakach biologicznych związanych z degradacją białek oraz regulacją światła naczyń krwionośnych. Można byłoby rozszerzyć

pytanie jaka jest ich rola w regulacji czynników regulujących napięcie naczyń krwionośnych? Oczywiście trudno jest oczekiwać bezpośredniej prostej odpowiedzi. Przedstawione wyniki są na pewno znaczącym wkładem dla pełnego odkrycia znaczenia wybranych genów (np.: PDZRN4 i PRKG1) dla tolerancji bydła na stres cieplny. Można zatem stwierdzić że prezentowana praca dostarcza cennych danych na temat potencjalnych markerów genetycznych w przyszłych badaniach podstawowych ale i aplikacyjnych związanych selekcją w programach hodowlanych.

W kontekście uzyskanych wyników kuszącym wydaje się wykorzystanie ich jako wyjściowych w przyszłych analizach związanych z ekspresją genów, czy też weryfikacji wzajemnej interakcji genotypu gospodarza z mikrobiomem jelitowym zarówno w normalnych warunkach jaki pod wpływem stresu cieplnego.

5. Wyniki zrealizowanych badań

Reasumując wyniki przedstawione w rozprawie stwierdzam, że Doktorant integrując różne metody analityczne oraz statystyczne i bioinformatyczne, wykazał się szeroką wiedzą oraz skrupulatnością w planowaniu, jak i w opracowywaniu danych uzyskiwanych w tzw. wielkoskalowych analizach. Można uznać również za szczególnie interesujące i godne podkreślenia wykorzystanie różnorodnych metod obliczeniowych statystycznych i bioinformatycznych. Przedstawione w recenzji drobne uwagi i sugestie nie umniejszają wysokiej merytorycznej wartości rozprawy doktorskiej.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023, poz. 742 ze zm.) i wnoszę o dopuszczenie mgr Bartosz Czecha do dalszych etapów postępowania doktorskiego, jak również z uwagi na nowatorskie szerokie i złożone analizy wnoszę o wyróżnienie niniejszej rozprawy.


Prof. dr hab. Mariusz Pierzchała