

Dr hab. Tomasz Ząbek, prof. IZ-PIB
Dział Genomiki i Biologii Molekularnej Zwierząt
Instytut Zootechniki-Państwowy Instytut Badawczy

Recenzja

pracy doktorskiej Pani mgr Moniki Stefaniuk-Szmukier pt. "Polimorfizm genu MSTN u wybranych ras koni w Polsce" wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Marii Kulisy w Zakładzie Hodowli Koni na Wydziale Hodowli i Biologii Zwierząt Uniwersytetu Rolniczego im. H. Kollątaja w Krakowie

Rozwój badań nad poznawaniem genomów zwierząt gospodarskich doprowadził do identyfikacji genetycznego podłoża szeregu cech istotnych w hodowli i produkcji zwierzęcej. U wielu gatunków zwierząt hodowlanych zidentyfikowano regiony genomu, których polimorfizm warunkuje bądź wykazuje silny związek ze zmiennością fenotypu cech użytkowych. W przypadku koni zidentyfikowano szereg regionów QTL bądź określone warianty genetyczne, które warunkują zmienność cech pokroju, umaszczenia, płodności, występowania chorób dziedzicznych bądź chorób o podłożu wieloczynnikowym, a nawet zmienność cech związanych z użytkowaniem wyścigowym. W ramach wyżej wymienionych badań zidentyfikowano również warianty genów o tzw. dużym efekcie, które u wysokoprodukcyjnych gatunków zwierząt stanowią podstawę selekcji wspomaganą markerami, zwiększając postęp hodowlany przy znacznym obniżeniu kosztów prowadzonej selekcji. Jednym z nich jest gen kodujący miostatynę – białko będące negatywnym regulatorem wzrostu mięśni szkieletowych. Wariant tego genu w określonym układzie genotypowym blokuje wytwarzanie aktywnego białka, w rezultacie warunkując występowanie fenotypu tzw. hipertrofii mięśniowej. Zmienność genetyczna w *locus* miostatyny jest między innymi uwzględniana w programach hodowlanych bydła mięsnego, a także nabiera coraz większego znaczenia u gatunków małych przeżuwaczy. Na uwagę zasługuje również komercyjne wykorzystanie polimorfizmu tego genu w selekcji na cechy użytkowości wyścigowej u określonych ras koni. Kolejną kwestią jest potencjalne wykorzystanie zmienności *locus* „hipertrofii mięśniowej” w selekcji na cechy umięśnienia u koni. Poszukiwanie genetycznego podłoża predyspozycji koni do wykonywania wysiłku fizycznego stanowi aktualnie ogólny trend w genetyce tego gatunku zwierząt gospodarskich.

Mając na względzie predyspozycje koni o różnych kierunkach użytkowości mgr Monika Stefaniuk-Szmukier podjęła się kompleksowej oceny zmienności genetycznej w *locus* genu miostatyny w populacjach czterech ras i jednego typu użytkowego koni hodowanych w Polsce. Charakterystyce poddała zmienność nowo wykrytych polimorfizmów w *locus* MSTN u koni czystej krwi arabskiej, koni huculskich, koników polskich oraz polskich koni zimnokrwistych jak również dokonała oceny potencjalnego wpływu polimorfizmu typu SNP na cechę wysokości w kłębie u koni czystej krwi arabskiej w różnych okresach rozwoju osobniczego. Uzyskane wyniki przez Panią mgr Stefaniuk stanowią solidną podstawę dla dalszych badań z zakresu ekspresji genów oraz badań funkcjonalnych odnoszących się do metabolizmu mięśni szkieletowych u koni o różnych kierunkach użytkowania.

Podstawowym walorem w ocenie zmienności sekwencji w *locus* miostatyny w prezentowanej pracy jest dobór do analizy prób DNA od pokaźnej liczby 491 koni pochodzących z 10 ośrodków hodowlanych. Autorka wykorzystwała szereg prawidłowo dobranych technik z zakresu genetyki molekularnej począwszy od metod przygotowania i zabezpieczenia kwasów nukleinowych, poprzez etapy amplifikacji matrycy DNA, aż do trafnego zastosowania rozmaitych rozwiązań w analizie polimorfizmu genetycznego w zależności od składu sekwencji nukleotydowej oraz wielkości próby. Dopelnieniem wykorzystanych metod molekularnych jest zastosowanie całego panelu rozwiązań bioinformatycznych w interpretacji i analizie wyników, w celu wychwycenia biologicznego kontekstu zidentyfikowanych polimorfizmów SNP oraz charakterystyki zmienności genetycznej w poszczególnych populacjach koni, zobrazowanej za pomocą programów do rekonstrukcji haplotypów na bazie polimorfizmu SNP. Ewentualnym uzupełnieniem uzyskanych wyników zmienności w *locus* MSTN mogłoby być zobrazowanie relacji filogenetycznych między porównywanymi rasami koni w formie dystansu genetycznego, które pokazałoby stopień różnic genetycznych z uwzględnieniem grup koni w typach gorącokrwistym i zimnokrwistym oraz odrębności genetycznej w przypadku prymitywnych czy szlachetnych ras koni. Odniesienie wyników analizy dystansu genetycznego do zmienności na poziomie zróżnicowania haplotypów SNP wskazałoby na pochodzenie populacji badanych ras koni, które wynika z rozwoju ich hodowli.

Informacja o zmienności zidentyfikowanych *loci* SNP w odniesieniu do prymitywnych ras koni w tej pracy, stanowi znaczny wkład w badania nad różnorodnością genetyczną tego gatunku zwierząt hodowlanych. Nowo adnotowane *loci* SNP powiększają światowy panel

markerów SNP zidentyfikowanych w ramach projektów dotyczących badań nad zmiennością genomu konia.

Przedstawiona rozprawa doktorska jest oparta na jednolitym tematycznie cyklu artykułów, spośród których dwa to artykuły opublikowane w czasopismach anglojęzycznych. Artykuł przeglądowy zatytułowany „Polimorfizm genu miostatyny (MSTN) u zwierząt domowych” opublikowany w czasopiśmie *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* (IF = 0,573), oraz praca oryginalna „Identification of a New Haplotype within the Promoter Region of the MSTN Gene in Horses from Five of the most Common Breeds in Poland” opublikowana w czasopiśmie *Folia Biologica* (IF = 0,882), to prace z 2014 roku. Drugi artykuł oryginalny pt. „Analysis of polymorphisms in the equine MSTN gene in Polish populations of horse breeds” ukazał się w 2016 roku w czasopiśmie *Livestock Science* (IF = 1,171). Łączny „impact factor” dla wyżej wymienionych czasopism wynosi 2,626. Pani Monika Stefaniuk-Szmukier jest pierwszą autorką wyżej wymienionych prac.

Początek rozprawy doktorskiej Pani mgr Moniki Stefaniuk-Szmukier stanowi formę przeglądu literatury na temat polimorfizmu genu miostatyny u różnych gatunków zwierząt gospodarskich, który rozpoczyna krótki wstęp dotyczący osiągnięć z zakresu genetyki konia domowego. Wstęp rozpoczyna się prezentacją aktualnej wiedzy na temat zidentyfikowanych mutacji odpowiedzialnych za szereg chorób dziedzicznych oraz charakterystykę zidentyfikowanych loci QTL u różnych ras koni.

Rozdział wprowadzający do molekularnej charakterystyki genu kodującego białko miostatynę, rozpoczyna się szczegółową prezentacją pokrewnych jemu białek TGF- β , które pełnią funkcje transformujących czynników wzrostu. Kolejne partie wstępu odnoszą się już do genu MSTN i jego wpływu na cechy mięsności oraz na inne bardziej lub mniej korzystne efekty fenotypowe udokumentowane u bydła, owiec, kóz, psów i koni. Uwagę zwraca szczególnie a zarazem zwięzły charakter opisu szeregu mutacji warunkujących poszczególne fenotypy u wymienionych gatunków zwierząt hodowlanych, ze szczególnym naciskiem na charakterystykę wariantów genetycznych w *locus* miostatyny i ich efektu na cechy użytkowości wyścigowej oraz wysokości w kłębie u koni.

Cele pracy są jasno sformułowane a dobór i dokumentacja materiału badawczego oraz zastosowane techniki molekularne, narzędzia bioinformatyczne oraz analizy statystyczne szczegółowo zaprezentowane.

Omówienie wyników, to forma dyskusji w odniesieniu do danych literaturowych, która obejmuje charakterystykę zmienności haplotypów w *locus* MSTN u pięciu ras koni, opis zidentyfikowanych mutacji w regionie promotorowym genu MSTN z uwzględnieniem ich potencjonalnej funkcji w regulacji aktywności tego genu w komórkach mięśni szkieletowych oraz zaprezentowanie roli określonych wariantów genetycznych *locus* MSTN w filogenetyce molekularnej gatunków koniowatych. Osobną część stanowi omówienie zależności pomiędzy polimorfizmem genu MSTN a różnicami w wysokości w kłębie w różnych okresach rozwoju osobniczego koni, udokumentowanych wynikami analizy statystycznej.

Rozprawa doktorska kończy się sześcioma wnioskami, stanowiącymi skondensowany zapis uzyskanych rezultatów badań.

Recenzowana dysertacja jest efektem ogromnego nakładu pracy popartego ogromną pasją badawczą Autorki, stanowiąc punkt wyjścia do dalszych badań w zakresie molekularnych podstaw biologii tkanki mięśniowej u koni użytkowanych w sporcie.

Przedstawiona przez mgr Monikę Stefaniuk-Szmukier praca spełnia wszystkie wymogi określone w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. Rozdział 2, Art. 13, Ust 2 (z późniejszymi zmianami), wobec czego stawiam wniosek o dopuszczenie Pani mgr Moniki Stefaniuk-Szmukier do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Pani mgr Monika Stefaniuk-Szmukier w swojej pracy potrafi doskonale łączyć aktualną wiedzę dotyczącą hodowli i genetyki koni z umiejętnościami z zakresu genetyki molekularnej, co doprowadziło ją do uzyskania bardzo interesujących wyników wykonanych badań. Biorąc pod uwagę ogrom włożonej pracy, polegającej na starannej organizacji materiału badawczego oraz całkowitego zaangażowania w badania z zakresu genetyki molekularnej stawiam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani Moniki Stefaniuk-Szmukier.

Balice 8 czerwca 2016

Tomasz Kysleś