

### Recenzja

Rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Dagmary Antoń  
W formie monografii pod tytułem:

„Analiza polimorfizmu genu *ACTN3*  
w aspekcie cech użytkowych świń”

Gen *ACTN3* koduje białko  $\alpha$ -aktynę 3, należące do rodziny białek wiążących filamenty aktynowe w miofibrilach mięśni poprzecznie prążkowanych. Gen ten ulega ekspresji we włóknach mięśniowych głównie szybko-kurczliwych, typu II, a białko  $\alpha$ -aktyny 3 wchodzi w skład dysków Z, które z kolei intensywnie się kurczą i w wysokim stopniu narażone są na mikrourazy spowodowane treningiem. Ponadto  $\alpha$ -aktyna 3 może wpływać na przemiany glukozy w odpowiedzi na trening, a także promuje powstawanie włókien szybko-kurczliwych. Stąd duże zainteresowanie tym białkiem właśnie w kontekście sprawności fizycznej oraz sportów wyczynowych. Mutacje w ludzkim genie *ACTN3* są badane pod kątem ich wpływu na prawidłową funkcję i strukturę białka  $\alpha$ -aktyny 3. Gdzie np. często występujący w populacji ludzkiej polimorfizm (Arg577Stop, R577X) powodujący wystąpienie przedwczesnego kodonu stop i powstawanie dysfunkcyjnego białka, powiązано z wybitnymi predyspozycjami do sportów wytrzymałościowych i wykonywania wysiłków ekscentrycznych, co związane było z wystąpieniem wyższej proporcji włókien szybko kurczliwych u osobników o genotypie RR. Także badania na gatunku mysz domowa wykazały, że niedobór białka  $\alpha$ -aktyny 3 u osobników „znokautowanych” spowodował zmiany w metabolizmie mięśni w kierunku bardziej efektywnych szlaków tlenowych, co związane było z wyższymi predyspozycjami wytrzymałościowymi. Mutacje w genie *ACTN3* rozpatrywane były także u koni arabskich jako potencjalny marker selekcyjne powiązany z lepszymi wynikami treningowymi i wyścigowymi.

Od innej strony patrząc, obecnie wieprzowina jest jednym z najczęściej spożywanych rodzajów mięsa na świecie, a dowody na początki utrzymywania świń przez człowieka jako potencjalne źródło białka sięgają nawet roku 5000 przed naszą erą. Wieprzowinę spożywamy zarówno świeżo ugotowaną, jak i przetworzoną w postaci np. wędlin czy konserwowaną. W zależności od rodzaju kuchni, regionu świata czy tradycji, wieprzowina przerabiana jest na wiele różnych sposobów, a lokalne produkty wykonane na bazie tego mięsa uważane są w wielu miejscach za rarytasy i służą do promowania kultury danego regionu.

W dobie szybko rozwijających się technologii także w zakresie genetyki i biologii molekularnej, w hodowli świń podejmowane są różne próby mające na celu uzyskanie szybszego postępu hodowlanego, starając się sprostać szybko zmieniającym się gustom konsumentów. Jednym z takich sposobów jest opracowanie genetycznych markerów selekcyjnych, które już u młodych zwierząt wskazywałyby potencjał hodowlany, bez konieczności oceniania dorosłych, już w pełni ukształtowanych osobników, co oczywiście wiąże się ze zmniejszeniem kosztów utrzymania. Aktualnie w polskiej hodowli jako marker selekcyjny u świń, monitorowana jest jedynie obecność mutacji w genie *RYRI*, która związana jest z wadą mięsa PSE (blade, wodniste i kwaśne) czy upadkami prosiąt podczas transportu. W krajach zachodniej Europy czy Stanach Zjednoczonych jako markery selekcyjne wykorzystywane są także informacje o mutacjach w genach *IGF2* czy *MC4R* związane z wyższą mięsnością tuszy oraz wyższym poborem paszy. Obecnie na świecie trwają liczne badania mające na celu opracowanie nowych markerów selekcyjnych, które skutecznie mogłyby wspierać prowadzone zbiegi hodowlane, aby przyspieszyć oczekiwany postęp.

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Dagmary Antoń

### *Oryginalność badań*

Rozprawa Pani mgr inż. Dagmary Antoń przygotowana została w języku polskim, z dołączonym streszczeniem w języku polskim oraz angielskim. Przedstawiona rozprawa doktorska w formie niepublikowanej monografii naukowej liczy 106 stron i posiada typowy układ dla tego typu opracowań.

Tematyka z zakresu poszukiwania i opracowania prostych markerów selekcyjnych na podstawie polimorfizmu DNA, jest przedmiotem wielu badań i wciąż jest aktualna. Dzisiaj opracowanie dobrych biomarkerów stanowi duże wyzwanie dla naukowców, ponieważ najlepszym markerem byłaby pojedyncza mutacja, łatwo i tanio identyfikowalna, wywołująca silny efekt fenotypowy. Niestety takie przypadki w odniesieniu do cech produkcyjnych, które zwykle mają wielogenowe podłoże genetyczne są bardzo rzadkie. U świń w Polsce, jak dotąd nie wprowadzono obowiązkowej oceny genomowej jak dla bydła mlecznego, jednak w różnych krajach badania nad tworzeniem populacji referencyjnej, oceny metod przewidywania i korzyści dla przyspieszenia postępu genetycznego w hodowli trzody chlewnej wciąż trwają, dlatego też może w niedalekiej przyszłości także świnie będą objęte obowiązkową oceną genomową. Póki co jednak, dostępna literatura dotycząca hodowli trzody chlewnej jest stale wzbogacana o nowe informacje z zakresu potencjalnych/pojedynczych biomarkerów.

W przedstawionej rozprawie doktorskiej analizie poddano fragment genu *ACTN3* u świń w celu opracowania biomarkerów, które można by było wykorzystać podczas selekcji w kierunku poprawy pożądaných cech użytkowych. Gen *ACTN3* jak dotąd nie był badany u tego gatunku, ponieważ w jego polimorfizmie doszukiwano się dotychczas możliwości poprawy cech związanych z wytrzymałością sportową, co nie dotyczy hodowli świń. Gen ten jednak koduje istotne białko związane z włókami mięśni poprzecznie prążkowanych/szkieletowych, co może mieć także znaczenie dla hodowli trzody chlewnej. Dlatego też, podjęta przez doktorantkę tematyka dotycząca próby identyfikacji potencjalnych markerów selekcyjnych w obrębie fragmentu genu *ACTN3* jest innowacyjna, wpisuje się w obszar badań podstawowych

z zakresu nauk rolniczych, a także w nurt nowoczesnych badań genetycznych, co może w przyszłości zostać wykorzystane przy opracowywaniu oceny genomowej świń.

W przedstawionej pracy doktorskiej zostały zastosowane aktualnie szeroko wykorzystywane metody z zakresu biologii molekularnej (analiza wyników sekwencjonowania oraz metody identyfikacji poszczególnych genotypów na bazie technik PCR-RFLP oraz PCR-ACRS) oraz biostatystyki (analiza asocjacyjna zidentyfikowanych zmian polimorficznych z ważnymi użytkowo cechami trzody chlewnej, w tym cechami tucznymi, rzeźnymi oraz związanymi z jakością wieprzowiny). Dysertacja została przygotowana w sposób staranny, przejrzysty i spójny. W niektórych jednak miejscach zastosowano zwroty z mowy potocznej, jak np. wyraz „zaś” stosowany w rozprawie bardzo często, który w opracowaniach naukowych powinien zostać zastąpiony np. wyrazem „natomiast”. Drobne błędy językowe zostały wskazane w dalszej części omówienia. W części oceny merytorycznej, oceny kolejnych rozdziałów wskazane zostały głównie uwagi, które należy uwzględnić przy przygotowaniu pracy jako publikację.

### *Wstęp, przegląd piśmiennictwa i cele badawcze*

Wstęp liczy dwie strony. W ostatnim jego akapicie sformułowano hipotezę badawczą. W mojej opinii dość krótko, hipoteza mogłaby zostać rozwinięta o informacje czego spodziewamy się po zidentyfikowanych zmianach polimorficznych, które pozytywnie korelowałyby z cechami użytkowymi świń i mogły by zostać wykorzystane jako biomarkery DNA wspierające tradycyjne zabiegi selekcyjne w celu uzyskania szybszego postępu hodowlanego. Dość słabo uargumentowana została również przyczyna, dlaczego do badań w kontekście oceny wpływu na cechy użytkowe świń został wybrany właśnie gen *ACTN3*.

Część dotycząca przeglądu literatury liczy 14 stron. Zawiera ona informacje o znaczeniu mięsa wieprzowego, jego cech jakościowych, które zostały tu szczegółowo opisane, o rodzaju włókien mięśniowych, zaangażowaniu białka alfa-aktyniny w ich tworzenie i metabolizm oraz informacje dotyczące genu *ACTN3* kodującego to białko u świń, a także o badaniach struktury tego genu u innych gatunków. Tytuł rozprawy brzmi „Analiza polimorfizmu genu *ACTN3* w aspekcie cech użytkowych świń”, w związku z powyższym w przeglądzie literatury zabrakło mi choćby rozdziału w jaki sposób białko aktyniny mogłoby wpływać na fenotyp świń w zakresie innych cech niż cechy jakości mięsa. Ogólnie rozdział ten jest napisany w sposób przejrzysty i spójny. W kilku miejscach znalazłam sformułowania, które bardziej pasuje do języka poetyckiego, a nie naukowego: „kolor świeżego mięsa powinien mieścić się w palecie odcieni od..” należało by tu zastosować „kolor mięsa powinien mieścić się w zakresie od.., podobnie: „zabarwienie wpadające w kolor żółty” można by było zastąpić – „zabarwienie o odcieniu żółtym”. W części dotyczącej odczynu mięsa znalazłam dużo błędów stylistycznych, słabo sformułowanych zdań i brakujących wyrazów. Jeśli ten rozdział posłużyłby jako wstęp przy przygotowaniu pracy do druku proponowałabym go przeredagować. W rozdziale gen *ACTN3* u świń można by było dodać informację na której linii gen ten jest zakodowany. Dodatkowo, w kilku miejscach w pracy wskazane zostało, że gen *ACTN3* pełni funkcję biologiczną, a informacje te odnoszą się do białka aktyniny a nie do genu. Proszę zwrócić na to uwagę przy przygotowaniu pracy do druku. W rozdziale badania genu *ACTN3* doktorantka napisała, że u homozygot X557X w teorii nie jest produkowane prawidłowe białko alfa

aktyniny. **I tu moje pytania: Czy tylko w teorii czy nie potwierdzono tego eksperymentalnie? Dodatkowo, czy nie ma informacji na temat kobiet o genotypie X557X w zakresie lepszych wydajności sportowych, czy badano tylko mężczyzn? Jaki jest procent tej mutacji w populacji ludzkiej? W odniesieniu do informacji o myszy domowej - nie zostało wskazane co oznacza genotyp XX, czy także występuje tam mutacja powodująca przedwczesny kodon stop?**

W związku z tym, że doktorantka wybrała do badań sekwencję regionu 5'UTR oraz początek genu *ACTN3*, we wstępie zabrakło mi informacji dlaczego akurat wybrano ten fragment, jaką funkcję pełni, regulatorową czy strukturalną w odniesieniu do białka *ACTN3*, dlaczego jest on ciekawy w kontekście typowania biomarkerów.

Do głównego celu pracy można by było również dodać informację jakie znaczenie ma taka analiza, co wnosi informacja na temat obecności różnych wariantów genu *ACTN3* oraz ich wpływu na cechy użytkowe świń.

### *Material i metody*

Rozdział materiał i metody liczy 10 stron. Ogólnie został on jasno i czytelnie przedstawiony, znalazłam w nim tylko kilka drobnych literówek. Niemniej jednak mam kilka uwag do tego rozdziału - Rycina 7. pierwszy punkt powinien brzmieć opracowanie testu, a nie projekt. Elektroforeza w żelu agarozowym powtarza się dwa razy, dlatego też w drugim okienku powinno zostać dodane w nawiasie, że elektroforeza jest przeprowadzana, w celu identyfikacji zmian polimorficznych. W składzie mieszaniny reakcyjnej PCR nie powinien znaleźć się bufor obciążający, który wykorzystuje się do elektroforezy, ponieważ blokował by on tą reakcję. Nagłówek Tabeli 3. brzmi mało precyzyjnie: „skład pojedynczej mieszaniny reakcyjnej” – można by było zastąpić skład mieszaniny w przeliczeniu na jedną próbkę. Ilość osobników przeanalizowanych z wykorzystaniem sekwencjonowania metodą Sanger, którą wykonano z wykorzystaniem serwisu zewnętrznego zawierała mało reprezentatywną ilość prób tylko 6 po dwa osobniki z każdej z ras. Prawdopodobnie przy większej ilości prób zidentyfikowano by więcej wariantów genu *ACTN3*, ale to oczywiście wiązało by się z wyższymi kosztami analizy.

Na stronie 37 w podrozdziale analiza statystyczna, brak informacji czy wykorzystane do badania zwierzęta, były ze sobą spokrewnione? **Proszę o uzupełnienie informacji w tym zakresie.** Ponieważ jeśli badane zwierzęta były spokrewnione, w modelu statystycznym powinien zostać uwzględniony efekt matki i/lub ojca. Jeśli wykorzystane osobniki nie były spokrewnione należało by dodać taką uwagę. **Dodatkowo, czy wszystkie uwzględnione w badaniu zwierzęta były wolne od mutacji w genie *RYRI*? Czy to zostało sprawdzone?**

W mojej opinii rozdział Materiał i Metody został opisany dość szczegółowo, w zakresie wykorzystanych metod molekularnych i statystycznych. Ewentualne powtórzenie procedur w oparciu o opisy zaprezentowane przez doktorantkę nie stanowiłoby problemu. Drobne błędy językowe i doprecyzowanie kilku wskazanych elementów należy uwzględnić przy przygotowaniu publikacji.

### *Wyniki*

Wyniki zostały zaprezentowane na 40 stronach, w postaci 30 Tabel oraz 9 Rycin.

Rozdział ten został rozbity na wiele podrozdziałów w pierwszej części przedstawiono wyniki dotyczące identyfikacji zmian polimorficznych we fragmencie genu *ACTN3* u świń, druga prezentowała badania asocjacyjne oceniające wpływ zidentyfikowanych zmian polimorficznych na cechy tuczne, rzeźne, jakość wieprzowiny oraz rodzaje i ilości włókien w najdłuższym mięśni grzbietu, w wycinku pobranym na wysokości 5. kręgu odcinka lędźwiowego kręgosłupa.

Rycina 8. prezentująca amplikony uzyskane po reakcji PCR dla fragmentu genu *ACTN3*, nie do końca jest jasna, w jakim celu zaprezentowano amplikony dla każdej próbki bez konkretnych podpisów od jakiej rasy pochodzą, może wystarczyłoby zaprezentować jeden uzyskany produkt wraz z próbą negatywną (zamiast DNA do reakcji dodana woda), i kolejno opisać, że takie produkty uzyskano dla każdej z 6 prób. Obecna Rycina 8. wprowadza lekkie zamieszanie, nie zostało podpisane dlaczego badano tu 6 próbek i dlaczego uzyskane produkty mają różną gęstość prążka. Proponowane rozwiązanie usunęło by te wątpliwości, co można wykorzystać przy przygotowaniu pracy do druku. We fragmencie opisującym zidentyfikowane kolejno polimorfizmy zabrakło informacji czy te mutacje są znanymi polimorfizmami, opisanymi już wcześniej, bądź zdeponowanymi w bazach genetycznych, taka informacja znalazła się później w Tabeli 10., jednak powinno to zostać umieszczona także w tekście wraz z odwołaniem do Tabeli 10. Ponadto doktorantka zidentyfikowała nową zmianę polimorficzną (SNP1), co powinno zostać podkreślone. Zidentyfikowane zmiany polimorficzne w zależności od izoformy genu *ACTN3* pełnią różną funkcję jak np. SNP4, który tylko dla jednej z izoform stanowi mutację typu „zmiana sensu” dla innej mutacja ta zlokalizowana jest w sekwencji 5'UTR. Takie informacje też powinny zostać zawarte w tekście opisującym uzyskane wyniki. Ryciny prezentujące chromatogramy zaprezentowane zostały mało czytelnie, miejsce ze zmianą polimorficzną można było podświetlić lub wziąć w ramkę, ponadto prócz form heterozygotycznych przedstawić formy homozygotyczne, jeśli oczywiście znalazły by się w grupie 6 badanych prób. Dodatkowo, w tekście brak informacji w jakim regionie genu znajduje się każda zidentyfikowana mutacja, pomimo zawarcia tych informacji w Tabeli 10. Generalnie opis do tej części został mało szczegółowo zaprezentowany.

Podrozdział dotyczący wyników po genotypowaniu zidentyfikowanych mutacji został opisany starannie i szczegółowo. Choć jedna uwaga dotyczy Rycin, dlaczego na jednej zaprezentowano wyniki od 9 próbek a na innej dla 6? Na tych Rycinach lepiej byłoby pokazać wyłącznie 3 próbki prezentujące wszystkie obserwowane dla danej mutacji genotypy plus ewentualnie próba ślepa (woda zamiast DNA w reakcji PCR), prezentacja zaproponowana przez doktorantkę jest mało spójna. Dodatkowo na Rycinie 14. na ścieżce 1. brak markera długości DNA wskazanego w opisie. W kolejnych podrozdziałach przedstawione zostały frekwencje oraz wyniki badań asocjacyjnych zidentyfikowanych zmian polimorficznych z cechami użytkowymi świń. **Pytanie, w jakim celu doktorantka obliczała równowagę Hardy-Weinberga, o czym świadczy, że populacja jest lub nie jest w tej równowadze, bardzo proszę o wyjaśnienie, bo nie jest to nigdzie później omawiane. Dodatkowo nie zostało omówione uzyskanie najwyższych wartości danej cechy dla form heterozygotycznych – o czym to świadczy proszę o wyjaśnienie.** Nie wszystkie istotne wyniki prezentowane w Tabelach licząc od 20. zostały skomentowane. W Tabelach dotyczących tekstury mięsa zaobserwowałam istotny spadek osobników badanych, dobrze by

było wskazać w takich sytuacjach ile osobników przypadło na konkretną grupę genotypową, np. w przypadku rasy puławska tylko 65 osobników zostało przebadanych dla SNP1, gdy w innych analizach badanych było 155 osobników, wśród nich odnotowano tylko 8 homozygot TT, ile homozygot TT uwzględniono w tej analizie, gdzie oceniano wpływ na cechy związane z teksturą mięsa? Drobne uwagi językowe do tej części i) raz używany jest czas przeszły raz teraźniejszy, wszystko powinno zostać zaprezentowane w czasie przeszłym, ii) odczyn pH raz z opisano z małej raz z dużej litery, należy skorygować na dużą literę.

Podsumowując, prócz drobnych uwag rozdział ten został przygotowany starannie i przejrzyście, co umożliwiło łatwe śledzenie kolejno zaprezentowanych wyników.

## Dyskusja

Rozdział ten został przedstawiony na 10 stronach i stanowi słabszą część zaprezentowanej dysertacji. W kolejnych podrozdziałach dyskusji, zostały powtórzone informacje zaprezentowane wcześniej w rozdziale wyniki. W każdym z podrozdziałów omawiane są raczej inne geny wpływające na cechy użytkowe świń, gdzie doktorantka powinna skupić się na genie *ACTN3*. Od strony merytorycznej w tej części brakuje omówienia dlaczego wybrano do badań właśnie taki fragment genu *ACTN3*, jaką funkcję pełni jeśli obejmuje głównie region 5'UTR i nie koduje samego białka. W tym miejscu można by było omówić również funkcję regionu 5'UTR. Dodatkowo, do dyskusji można by było dodać informacje o samym genie *ACTN3* u świń, co zostało zgłoszone dotychczas w różnych publikacjach: i) na jakim poziomie jest jego ekspresja w mięśniach szkieletowych, ii) czy wszystkie izoformy ulegają ekspresji w mięśniach szkieletowych, iii) czy coś wiemy o jego regulacji epigenetycznej u świń (przykładem takich informacji dotyczące metylacji *ACTN3* u świń jest praca Zang et al. 2022, Coordinated transcriptional and post-transcriptional epigenetic regulation during skeletal muscle development and growth in pigs). W całej pracy nie znalazłam mocnego argumentu, dlaczego właśnie ten gen został wybrany do badań, jeśli pierwotnie był rozpatrywany w kontekście wydolności sportowych. Jeśli zostało wskazane, że jego białko jest związane z tworzeniem dysków Z, nigdzie nie ma informacji jakie znaczenie ma ten element strukturalny dla jakości mięsa wieprzowego (kruchości, IMF). Jeśli w bazach genetycznych mamy informacje na temat 3 ze zidentyfikowanych w tym badaniu mutacji to błędem jest wskazanie, że nie było badań dotyczących właśnie identyfikacji pojedynczych mutacji w genie *ACTN3*.

W dyskusji, wiele zdań mówiąc kolokwialnie wyrwanych jest z kontekstu, bez ciągu logicznego w odniesieniu do poprzednich. W wielu miejscach brakuje przecinków, i występuje wiele błędów stylistycznych. Dodatkowo znalazłam kilka błędnych sformułowań jak np. „poszukują mięsa... o wysokiej zawartości odżywczej”, gdzie rozumiem chodziło o wartość odżywczą, „mięso o niższym stopniu otłuszczenia”, gdzie takie sformułowanie odnosimy do zwierząt i powinno to brzmieć „mięso o niższej zawartości tłuszczu” czy „rozwój popytu”, gdzie lepiej zastąpić wzrost popytu. Na stronie 87 przedostatni akapit nie dotyczy omawiania wyników polimorfizmu SNP4 tylko stanowi rodzaj podsumowania i rozważania na temat informacji o genomie świni, dlatego też można było to przenieść do osobnego podrozdziału zatytułowanego podsumowanie.

Ponadto w dyskusji omówiono niewiele źródeł literaturowych. Część ta zyskałaby lepszą formę, gdyby komentarz do uzyskanych w przedstawionej dysertacji wyników, bezpośrednio odnosić do informacji zawartych w literaturze.

#### *Stwierdzenia i Wnioski*

Dysertacja została zakończona rozdziałem stwierdzenia i wnioski, jednak rozdział zawiera głównie stwierdzenia, brak np. informacji który z przebadanych polimorfizmów jest najlepszy jako potencjalny marker selekcyjny. Cennym wnioskiem byłaby tu również informacja, czy zidentyfikowane mutacje były podatne na prowadzoną dotychczas w stadach selekcje, o czym świadczyły analiza HWE, analiza nie została ona jednak omówiona, choć jej wyniki były prezentowane w rozdziale Wyniki.

#### *Cytowana literatura*

Dysertacja została przygotowana w oparciu o 78 pozycje literaturowe, które nie można zaliczyć do najnowszych ponieważ tylko 8% stanowiło publikacje wydane w okresie ostatnich 5 latach.

Podsumowując recenzję, pomimo wskazanych uwag, które nie umniejszają wniesionych wartości merytorycznych i poznawczych z zakresu informacji o genie *ACTN3* u świń w kontekście wykorzystania jego wariantów jako markera selekcyjnego w celu poprawy różnych cech użytkowych, z naciskiem na cechy związane z jakością mięsa wieprzowego, stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca doktorska wpisuje się jako badania podstawowe w obszar dziedziny nauk rolniczych, dyscyplinę biotechnologia i spełnia wymogi określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jedn. Dz. U. z 2017 r., poz. 1789).