

Recenzja rozprawy doktorskiej pt.:

***„Polimorfizm w regionach promotorowych i regulatorowych genów
o potencjalnym wpływie na poziom cech rozrodczych krów ras jersey i polskiej
holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej”***

wykonanej przez mgr inż. Sarę E. Tabor-Osińską

**w Katedrze Nauk o Zwierzętach Przeżuwiających
Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie
pod kierunkiem prof. dr hab. Iwony Szatkowskiej**

Obecnie prowadzone na bydłe prace hodowlane głównie ukierunkowane są na doskonalenie cech funkcjonalnych zwierząt. Do nich wlicza się wszystkie parametry pozaprodukcyjne, które mogą mieć wpływ na koszty produkcji czyli rozrodczość, zdrowotność, wykorzystanie paszy, zdolność wydojową i behavior. Znaczenie cech funkcjonalnych w relacji do opłacalności hodowli bydła i produkcji mleka wzrasta w miarę rosnącej przeciętnej wydajności mlecznej krów. Wytwarzanie mleka jako proces fizjologiczny uzależniony jest bezpośrednio od płodności. Korzystne wartości wskaźników rozrodczych tj. wieku przy pierwszym wycieleniu, indeksu unasienień, długości ciąży oraz okresów: spoczynku poporodowego, usługi, międzyciążowego i międzywycieleniowego odgrywają zasadniczą rolę w cyklu reprodukcyjno-produkcyjnym krowy mlecznej i wpływają w sposób bezpośredni na wskaźniki opłacalności produkcji mleka. U krów wysokowydajnych niekiedy występuje po ocieleniu ujemny bilans energetyczny związany z niedostateczną podażą energii co skutkuje wystąpieniem schorzeń metabolicznych, a także problemów z rozrodem. Najczęstszymi przyczynami brakowań krów ze stada są zaburzenia rozrodu. Płodność krów determinowana jest głównie środowiskiem w którym przebywają zwierzęta, aczkolwiek czynniki genetyczne także determinują tę cechę.

Nowoczesne techniki analizy DNA pozwalają na szczegółowe poznanie struktury genów zwierząt gospodarskich. Selekcja na podstawie oceny genotypu zwierzęcia jest przydatna szczególnie w doskonaleniu parametrów, które fenotypowo trudniej jest określić np. cechy rozrodu. Rozwój genomiki strukturalnej i funkcjonalnej umożliwia wytypowanie i zastosowanie markerów genetycznych w hodowli zwierząt. Efekty markerów sumuje się przy zastosowaniu modeli statystycznych i w rezultacie otrzymuje się tzw. genomową wartość hodowlaną. Ocena genomowa oparta jest na bazie funkcjonalnych rozpoznanych polimorfizmów pojedynczego nukleotydu tzw. SNP. Stąd ciągle aktualnym jest poszukiwanie genów oraz identyfikacja ich polimorfizmów związanych z poziomem cech użytkowych u zwierząt. Obecnie w przypadku bydła prowadzi się badania asocjacyjne całego genomu, które umożliwiają równoczesną identyfikacją tysięcy SNP oraz pozwalają na określenie ich związku

z daną cechą. Mechanizm ekspresji informacji genetycznej zawartej w postaci sekwencji nukleotydowej DNA ma charakter złożony i wieloetapowy. Istotną rolę w tych procesach odgrywają polimorfizmy dotyczące regionów regulatorowych i promotorowych genu. Bowiem w tych miejscach zlokalizowane są różnorodne motywy regulatorowe m.in. wiązania czynników transkrypcyjnych, które współdziałają ze sobą w procesie ekspresji informacji genetycznej. Polimorfizmy zmieniające strukturę motywów regulatorowych mogą oddziaływać na proces transkrypcji wpływając na ilość i funkcjonalność powstałego białka.

Podjęty przez mgr inż. Sarę Tabor-Osińską temat dysertacji doktorskiej jest interesujący i aktualny ma także duże znaczenie użytkowe. Autorka poszukiwała zależności między wariantami genetycznymi genów o potencjalnym wpływie na poziom cech rozrodczych, a wielkością wybranych wskaźników płodności u krów rasy jersey i polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej. Badania dotyczyły polimorfizmu w regionach promotorowych i regulatorowych bydłęcych genów insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (*IGF-1*), receptora estrogenowego 1 (*ER1*) i genu specyficznego dla oocytów (*JY-1*).

Badania doktorantki włączają się w nurt bieżących poszukiwań genów oraz identyfikacji ich form polimorficznych mogących mieć prawdopodobny wpływ na poziom cech reprodukcyjnych u bydła. Wybór genów może mieć związek z poziomem cech rozrodczych krów, gdyż ich rola biologiczna polega na regulacji procesów reprodukcyjnych u samic. A ponadto polimorfizm regionów promotorowych i regulatorowych genów *IGF-1*, *ER1*, i *JY-1* może warunkować ilość i zmienność kodowanych białek. Dlatego wybór tematyki badawczej przez mgr. inż. Sarę Tabor-Osińską uważam za trafny i mogący wnieść nową wiedzę w zakresie wyjaśnienia molekularnych mechanizmów regulujących zmienność cech reprodukcyjnych u krów mlecznych.

Układ pracy

Rozprawa ma formę klasycznej monografii i obejmuje 87 stron maszynopisu. Praca oprócz: „Wykazu skrótów (s. 5-8), „Aneksu” (s. 81-83), „Streszczenia” (s. 84-85) i „Abstractu” (s. 86-87), zawiera rozdziały główne tj.: „Wstęp” (s. 9-10), „Przegląd piśmiennictwa” wraz z trzema podrozdziałami (s. 11-34), „Cel pracy” (s. 35), „Materiał i metody” wraz z pięcioma podrozdziałami (s. 36-41), „Wyniki” wraz z czterema podrozdziałami (s. 42-55), „Dyskusję” (s. 56-65), „Stwierdzenia i wnioski” (s. 66) oraz „Bibliografię” (s. 67-80). W pracy zamieszczono 5 wykresów, 14 rycin i 17 tabel z czego 5 zawarto w „Aneksie”.

Ocena szczegółowa pracy

W rozdziale „Wstęp” w sposób syntetyczny, ale jednocześnie wyczerpujący wprowadzono do tematyki dysertacji doktorskiej jak również przedstawiono celowość prowadzenia zamierzonych badań.

Kolejny z rozdziałów „Przegląd piśmiennictwa” stanowi obszerny fragment pracy. W tej części opracowania przedstawiono dotychczasowe osiągnięcia naukowe w zakresie podjętej tematyki badań. Doktorantka z dużą starannością w sposób dokładny i wnikliwy opisała pełnią funkcję biologiczną insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (*IGF – 1*), receptora estrogenowego 1 (*ER 1*) i bydłęcego, specyficznego dla oocytów białka (*JY – 1*). Rozdział ten zawiera także podrozdziały charakteryzujące strukturę, ekspresję i polimorfizm genów: *IGF – 1*, *ER 1* i *JY – 1*. W przypadku dwóch pierwszych wymienionych genów (*IGF – 1*, *ER 1*) opisano również zależności między ich wariantami genetycznymi a wydajnością reprodukcyjną krów. Należy podkreślić, że ta część dysertacji została napisana w sposób interesujący a zarazem szczegółowy co wymagało przeglądu dużej liczby pozycji literatury głównie obcojęzycznej powiązanej z tematyką dysertacji doktorskiej. Świadczy to o dobrej znajomości

problematyki badawczej i wysokim merytorycznym przygotowaniu Doktorantki do realizacji podjętego celu pracy.

Cel pracy został jasno postawiony i dotyczył analizy związku między wariantami polimorficznymi w regionach regulatorowych genów *IGF-1*, *JY - 1* i *ER 1* a wybranymi cechami rozrodu u krów tj.: wiekiem przy pierwszym wycieleniu, skutecznością zapłodnienia, masą cielęcia oraz długością okresów: przestoju poporodowego, międzywycieleniowego, międzyciążowego i ciąży.

W tym rozdziale Autorka również umieściła trzy hipotezy badawcze. Zostały one sprecyzowane w sposób zrozumiały i logiczny. W pierwszej hipotezie badawczej założono, że występowanie ewentualnej zmienności w obszarze regulatorowym genu insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (*IGF-1*, GenBank: AF017143) może kreować lub znosić potencjalne wiązania czynników transkrypcyjnych przekładając się na poziom ekspresji *IGF-1*, co może mieć związek z poziomem cech reprodukcyjnych u krów. W drugiej z kolei Doktorantka zakłada, że zmienność sekwencyjna w obszarze 3'UTR genu specyficznego dla oocytów (*JY - 1*, GenBank: JF262042.2) może przypuszczalnie wpływać na stabilność mRNA bydłęcego, specyficznego dla oocytów białka (*JY - 1*) i wiązanie z białkami wspomagającymi jego transport do cytoplazmy oraz wydajność translacji. Te procesy mogą mieć powiązanie z ekspresją białka specyficznego dla oocytów (*JY - 1*) oraz funkcjami rozrodczymi krów. Trzecia hipoteza badawcza, zakłada, że zmiany sekwencyjne w regionie promotorowym genu receptora estrogenowego 1 (*ER 1*, GenBank: AY340597) mogą wpływać na poziom ekspresji receptora dla estrogenów i kształtować parametry rozrodu krów. Postawione hipotezy badawcze są właściwe i dobrze przemyślane wynikają z szczegółowej analizy dostępnej literatury dotyczącej funkcji oraz powiązania badanych genów z różnorodnymi ścieżkami sygnałowymi organizmu krowy związanych z jego reprodukcją.

Jednakże, w mojej opinii hipotezy badawcze powinny być umieszczone w osobnym rozdziale czy podrozdziale lub też ewentualnie razem z celem pracy (tak jak to jest w niniejszej dysertacji), lecz wówczas rozdział taki powinien być nazwany „Cel pracy i hipotezy badawcze”. Taka formuła pracy byłaby bardziej przejrzysta.

Rozdział „Materiał i metody” składa się z pięciu podrozdziałów, przy czym trzeci z nich tj.: 4.3 „Oznaczanie genotypów” zawiera trzy punkty. Badania zostały przeprowadzone w obrębie dwóch ras krów mlecznych pochodzących z trzech stad. W pierwszym stadzie liczba osobników doświadczalnych wynosiła 758 krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyskiej odmiany czarno-białej. Natomiast krowy rasy jersey objęte badaniami pochodziły z dwóch odrębnych stad, łączna ich liczba wynosiła 233 osobniki. Szkoda, że podrozdział 4.1 „Materiał badawczy” nie zawiera informacji dotyczących warunków utrzymania krów ich struktury wiekowej, poziomu produkcyjnego i systemu żywienia. Bowiem są to czynniki z grup środowiskowych i fizjologiczno-produkcyjnych, które mogły także oddziaływać na wielkość uzyskanych parametrów rozrodu krów. Zwłaszcza dotyczy to krów rasy jersey, które pochodziły z dwóch odrębnych stad. W przypadku kolejnych ewentualnie planowanych badań w celu wyeliminowania wpływu czynników tj. wieku i poziomu produkcji mleka sugerowałbym, żeby z grupy zwierząt doświadczalnych wybrać jałowice i zbadać związek wariantów genetycznych analizowanych genów z wybranymi parametrami rozrodu (np. skutecznością zapłodnienia, wiekiem przy pierwszym wycieleniu oraz długością okresu usługi inseminacyjnej i ciąży). Autorka stosując skrót myślowy podaje, że jednym z czynników poddanym analizie jest masa cielęcia, najprawdopodobniej dotyczy to urodzeniowej masy ciała oseska. W kolejnych podrozdziałach tj.: 4.2 i 4.3 Doktorantka w sposób szczegółowy przedstawiła metodykę dotyczącą: izolacji DNA, oznaczania genotypów wybranych genów do których wykorzystano techniki ACRS-RFLP (*IFG-1*) i PCR-RFLP (*ER1* i *JY-1*). W podrozdziale 4.4 dokonano opisu zastosowanych metod statystycznych. Szkoda, że w planowanych obliczeniach dotyczących częstości występowania poszczególnych alleli i genotypów analizowanych miejsc

polimorficznych nie uwzględniono analizy określającej stan równowagi genetycznej w poszczególnym *locus*. Bowiem taka informacja mogłaby świadczyć np. o stanie konsolidacji genetycznej badanej grupy krów uwarunkowanej ukierunkowaną pracą hodowlaną. Wpływ czynników na cechy rozrodcze krów analizowano według poprawnie skonstruowanego modelu statystycznego wykorzystując pakiet oprogramowania Statistica 10.0 (StatSoft). W podrozdziale 4.5 opisano metodykę analizy bioinformatycznej sekwencji regulatorowej P1 bydlęcego genów *IGF-1* i *ER 1*. Badania te polegały na analizie predykcji potencjalnych miejsc konsensusowych dla wiązania czynników transkrypcyjnych w miejscu/pobliżu analizowanych substytucji genu *IGF-1* i *ER 1*. W mojej opinii część doświadczalna opracowania została prawidłowo zaplanowana, zorganizowana i przeprowadzona. Do tego typu badań liczba zwierząt objętych doświadczeniem była wystarczająca, aczkolwiek im więcej jest osobników genotypowanych w analizowanych miejscach polimorficznych tym mniejsze jest prawdopodobieństwo występowania monomorfizmu. Praca pod względem metodycznym za wyjątkiem drobnych powyżej wymienionych spostrzeżeń nie budzi zastrzeżeń.

Rozdział „Wyniki” składa się z czterech podrozdziałów. Pierwszy z nich (5.1) dotyczy rezultatów badań własnych z zakresu identyfikacji wariantów polimorficznych analizowanych genów. W tym podrozdziale obok omówienia wyników badań własnych zamieszczono zdjęcia żeli agarozowych przedstawiające zamplikowane fragmenty badanych genów po rozdiale elektroforetycznym oraz elektroforetyczny rozdział fragmentów restrykcyjnych z oznaczonymi genotypami. W rozdziale 5.2 podano frekwencje otrzymanych alleli i genotypów badanych wariantów polimorficznych trzech genów. W przypadku genu *JY-1/BsrI* krowy jersey wykazały brak polimorfizmu (wystąpił wyłącznie dla tego *locus* wariant genetyczny *TT*). Autorka w tym podrozdziale konfrontuje wyniki swoich badań z rezultatami uzyskanymi przez innych autorów cytując wiele pozycji literaturowych. Podobny układ występuje w podrozdziale 5.4. W takiej sytuacji uważam, że obecne rozdziały pracy „Wyniki” i „Dyskusja” powinny być połączone we wspólny rozdział „Wyniki ich omówienie” lub „Wyniki i dyskusja”. W podrozdziale 5.3 opisano związek między wariantami polimorficznymi analizowanych genów a cechami użyteczności rozplodowej krów. Autorka zaprezentowała te zależności w sposób przemyślany, szczegółowy i kompletny. Wyniki analizy statystycznej przedstawiono w 10 tabelach z których 5 umieszczono w „Aneksie”. Ponadto w rozdziale „Dyskusja” znajduje się 5 wykresów z wynikami badań własnych. Uważam, że dla przejrzystości i ułatwionej analizy wyników i tendencji występujących w tabelach i wykresach należałoby zgrupować je razem w jednym rozdziale. Atutem pracy jest podjęcie się przez Doktorantkę zadania wskazania w obszarze regulatorowym genów *IGF-1* i *ER 1* przy wykorzystaniu analizy *in silico* potencjalnych miejsc konsensusowych dla zdefiniowanych bydlęcych czynników transkrypcyjnych mogących różnicować poziom ekspresji wyżej wymienionych genów. Mogłoby to stwarzać podstawy do wytłumaczenia zmienności cech reprodukcyjnych u krów. Jednakże wyniki zaprezentowane w podrozdziale 5.4 świadczą, o braku występowania w obszarze regulatorowym genów *IGF-1* i *ER 1* miejsc wiązania dla czynników transkrypcyjnych.

W rozdziale „Dyskusja” wykorzystano dużą liczbę tematycznie związanych pozycji literaturowych. Przedstawiona interpretacja wyników świadczy o dużej znajomości badanej tematyki i o umiejętności prowadzenia wyczerpującej dyskusji.

Rozdział „Stwierdzenia i wnioski” posiada trzy punkty, które w pełni korespondują z założonym celem i hipotezami badawczymi. Sformułowane zostały one jasno i poprawnie, a treść ich wynika z otrzymanych rezultatów badań. Cenną wartością pracy jest wykazanie zmienności w obrębie analizowanych genów, co umożliwiło poznać przyczyny międzyrasowych różnic w relacji do określonego poziomu cech rozrodczych. Autorka wykazała występowanie związku między polimorfizmem w obszarze regulatorowym P1 genu *IGF-1/SnaBI* z długością przestoju poporodowego u krów jersey oraz z skutecznością zapłodnień i długością okresu międzyciążowego u krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej

odmiany czarno-białej. W przypadku rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej stwierdzono, również istotne zależności między wariantami genetycznymi genu *JY-I/BsrI* z długością ciąży i okresu międzywycieleniowego. Z kolei zmiany sekwencyjne w regionie promotorowym genu *ERI* u krów jersey korelowały z długością okresu międzywycieleniowego. Natomiast u krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej genotyp *ERI/BgII* był powiązany z przestojem poporodowym. W moim przekonaniu również dzięki uzyskanym результатам badań została poszerzona wiedza dotycząca genetycznych mechanizmów kontroli cech reprodukcyjnych u bydła.

Bibliografia pracy jest bogata i ściśle powiązana z tematyką opracowania. Ponad 93 % zamieszczonej literatury stanowią pozycje obcojęzyczne. Niemalże wszystkie pozycje literaturowe cytowane w tekście pracy są umieszczone w „Bibliografii”.

Jednakże, przygotowując pracę do opublikowania sugerowałbym o ponowne jej przejrzanie i poprawę nielicznych nieścisłości związanych z cytowaniem literatury oraz drobnych błędów edytorskich i stylistycznych.

Wszelkie uwagi i sugestie zawarte w treści niniejszej recenzji wynikają wyłącznie z drobiazgowości i dociekliwości recenzenta i nie umniejszają wysokiej wartości merytorycznej dysertacji doktorskiej oraz jej pozytywnej oceny. Praca stanowi wartościowe opracowanie naukowe o dużych walorach poznawczych i aplikacyjnych.

Ocena końcowa

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji dysertacja doktorska mgr inż. Sary Tabor-Osińskiej pt. „Polimorfizm w regionach promotorowych i regulatorowych genów o potencjalnym wpływie na poziom cech rozrodczych krów ras jersey i polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej” w pełni odpowiada warunkom określonym w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytułach z zakresu sztuki (tekst jedn. Dz. U. z 2017 r., poz. 1789).

Przedstawiając ocenę pozytywną niniejszej pracy doktorskiej, zgłaszam wniosek do Wysokiej Rady Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie o dopuszczenie mgr inż. Sary Tabor-Osińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Poznań, 22.10.2019 r.

dr hab. Jarosław Pytlewski