

dr hab. Małgorzata Kajta
Zakład Neuroendokrynologii Doświadczalnej
Instytut Farmakologii PAN
ul. Smętna 12, 31-343 Kraków

RECENZJA

rozprawy doktorskiej magistra inż. Mirosława Kucharskiego
„Zmienność genetyczna w *loci* wybranych genów warunkujących przemianę kwasów
tłuszczowych u owcy domowej (*Ovis aries*)”

*Praca powstała pod kierunkiem dr hab. inż. Urszuli Kaczor
oraz dr inż. Katarzyny Piórkowskiej*

*w Pracowni Biotechnologii i Genomiki Katedry Biotechnologii Zwierząt Uniwersytetu
Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, a także w Dziale Genomiki i Biologii
Molekularnej Zwierząt Instytutu Zootechniki PIB w Balicach k. Krakowa*

Temat przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej dotyczy polimorfizmu genów związanych z przemianą kwasów tłuszczowych, a także ich ekspresji u owiec należących do 5 ras różniących się pod względem użytkowym. Są nimi: rasy suffolk i ile de france zaliczane do typu mięsnego, rasy owca olkuska i owca kołudzka zaliczane do typu mleczno-plennego, a także rasa polska owca górską uznawaną za typ prymitywny. Wybór genów stanowiących przedmiot badań został podyktowany udziałem ich produktów białkowych w przemianach kwasów tłuszczowych. Ponadto Doktorant obrał sobie za cel pełniejsze poznanie struktury genetycznej *FABP4*, *PPAR α* , *PPAR γ* i *SCD* oraz ustalenie zależności pomiędzy poziomem ekspresji wybranych genów a rasą (5 ras owcy domowej), wiekiem (3 miesiące vs 3 lata) i dietą owiec (*ad libitum* vs żywienie normowane mieszankami z różną zawartością kwasów oleinowego, α -linolenowego czy linolowego). Doktorant określił również profile kwasów tłuszczowych u owiec rasy ile de france oraz rasy owca kołudzka z uwzględnieniem różnic w diecie. Zważywszy na obecny stan wiedzy, podjęcie badań przedstawionych w obecnej rozprawie jest ze wszech miar zasadne. Co więcej, użycie nowoczesnych metod molekularnych do analizy wariantów polimorficznych i zmienności genetycznej, a także do

pomiaru ekspresji wybranych genów umożliwia uzyskanie wiarygodnych i wysoce oryginalnych wyników z zakresu genetyki i nutrigenomiki.

W obecnej rozprawie wśród genów będących przedmiotem badań znalazły się *PPAR α* i *PPAR γ* , które kodują receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów typu α i γ . Oprócz udziału w przemianie kwasów tłuszczowych, kontroli metabolizmu lipidów oraz zaangażowania w utrzymanie homeostazy glukozowej, wymienione receptory uczestniczą m.in. w rozwoju układu nerwowego oraz w odpowiedzi komórek nerwowych na różnego typu czynniki i bodźce uszkadzające. *PPAR α* wpływa na przepuszczalność bariery krew-mózg, a jego niedobór upośledza plastyczność synaptyczną oraz funkcje pamięci i uczenia się. *PPAR γ* występuje w nerwowych komórkach macierzystych regulując ich proliferację, migrację i różnicowanie. Zaburzenie ekspresji i/lub aktywności receptora *PPAR γ* jest związane z chorobami neurodegeneracyjnymi i nowotworami mózgu. *PPAR γ* jest obecnie uważany za nowy punkt uchwytu w leczeniu choroby Alzheimera i cukrzycy typu II, zaś *PPAR α* wydaje się obiecującym celem w terapii uzależnień. Ostatnio wykazano, że szlak *PPAR γ* wchodzi w interakcje z inhibitorami deacetylazy histonowej jak np. kwas walproinowy, co może prowadzić do zmiany statusu epigenetycznego komórek. Tematyka przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej jest zatem aktualna, a podjęte przez Doktoranta badania wpisują się w intensywne poszukiwania w tym obszarze wiedzy, zarówno na poziomie badań podstawowych, jak i potencjalnie użytkowych.

Rozprawa doktorska liczy 188 stron maszynopisu. Jej układ i podział na rozdziały w pełni odpowiada przyjętym standardom. Znajdujące się w rozprawie rozdziały: HIPOTEZY BADAWCZE I CELE PRACY, PODSUMOWANIE oraz STWIERDZENIA I WNIOSKI prowadzą czytelnika od stawianej hipotezy badawczej, poprzez argumenty na jej weryfikację aż do podsumowania i wniosków wysuniętych na podstawie przeprowadzonych badań. Na początku rozprawy zamieszczono WYKAZ SKRÓTÓW, a na końcu STRESZCZENIE w języku polskim i angielskim, co dodatkowo ułatwia precyzyjne poruszanie się w tematyce rozprawy. Staranna edycja tekstu, zebranie informacji nt. MATERIAŁU I METOD w 19 tabelach, a także przejrzysta prezentacja WYNIKÓW (47 rycin/wykresów, 6 zdjęć elektroforegramów, 16 tabel) to niewątpliwe zalety rozprawy. Spis literatury zacytowanej w rozprawie znajduje się w rozdziale PIŚMIENNICTWO i zawiera ponad 400 publikacji, głównie anglojęzycznych.

Zawarte na 2 stronach WPROWADZENIE stanowi doskonały wstęp do tematyki rozprawy. Uzasadnia celowość podjęcia badań i wybór genów do analiz, a także uwzględnia

wpływ rasy i wieku owiec oraz diety na ekspresję wybranych genów tj. genu kodującego 4. białko wiążące kwasy tłuszczowe (*FABP4*), genu kodującego receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów typu α (*PPAR α*), genu kodującego receptor *PPAR γ* , genu kodującego desaturazę stearylo-CoA (*SCD*). Analiza polimorfizmu genów dostarcza danych na temat częstych mutacji oraz ich znaczenia dla budowy i funkcji kodowanych przez nie białek. Zaproponowana przez Doktoranta analiza polimorfizmu wybranych genów ujawniła podatność większości z nich na mutacje i zidentyfikowała polimorfizmy, co w dalszej perspektywie przyspieszy wyodrębnienie najbardziej pożądanego przez hodowców wariantu genetycznego.

Na kolejnych 31 stronach rozprawy Doktorant przedstawia PRZEGLĄD LITERATURY. Znajdziemy w nim m.in. opis tkanki tłuszczowej z uwzględnieniem jej funkcji wydzielniczej i znaczenia w etiologii chorób układu sercowo-naczyniowego i cukrzycy typu II. W tym rozdziale poznamy również charakterystykę kwasów tłuszczowych i związanych z nimi białek będących produktami wybranych genów, a także dowiemy się wiele o modelu badań, jakim jest owca. Ten ostatni element ma szczególne znaczenie, ponieważ rozmiar i masa ciała owcy są zbliżone do parametrów cechujących człowieka. Model badań w postaci owcy jest znacznie bliższy biologii człowieka niż np. modele oparte na gryzoniach laboratoryjnych czy małych zwierzętach hodowlanych. Zaproponowany w obecnej pracy model badawczy jest atrakcyjny, zwłaszcza jeśli uzyskane na jego podstawie wyniki chcemy odnieść do człowieka. Jest to tym istotniejsze, że otyłość czy zaburzenia metaboliczne należą do chorób cywilizacyjnych i są wyzwaniem dla współczesnej medycyny. W omawianym rozdziale Doktorant opisuje wybrane geny oraz ich białkowe produkty i funkcje. Moją uwagę zwrócił opis białka *FABP4* i jego postulowana rola w powstawaniu blaszek miażdżycowych. Istotnie, najnowsze badania kliniczne i eksperymentalne dowodzą, że *FABP4* jest ważnym markerem miażdżycy naczyń wieńcowych i przerostu lewej komory serca.

Następnym rozdziałem są MATERIAŁ i METODY, który łącznie na 26 stronach zawiera szczegółowy opis niezbędnych materiałów i metod umożliwiających m.in. izolację genomowego DNA, zaprojektowanie odpowiednich starterów obejmujących regiony sekwencji egzonów, intronów oraz miejsc splicingowych, wysokorozdzielową analizę krzywych topnienia produktów PCR czy przeprowadzenie reakcji PCRseq i PCR-RFLP w celu detekcji oraz identyfikacji mutacji. Ponadto w wymienionym rozdziale znalazł się opis procedur związanych z pomiarem poziomu ekspresji wybranych genów z uwzględnieniem

rasy, wieku i diety zwierząt oraz opis analiz zawartych w tkance mięśniowej kwasów tłuszczowych. Jednak w obecnym rozdziale zabrakło jednoznacznego uzasadnienia dla wyboru krwi obwodowej (analizy zmienności genetycznej w sekwencjach kodujących wybranych genów) oraz tkanki mięśniowej i wątroby (pomiar poziomu ekspresji wybranych genów), jako tkanek z różnych względów najważniejszych do realizacji planowanych badań. Nie jest również do końca jasne, dlaczego wpływ wieku zwierząt na poziom ekspresji wybranych genów badano u samic owcy domowej, zaś wpływ diety na ekspresję genów badano u samców.

W kolejnym rozdziale zostały przedstawione WYNIKI, które zilustrowano wspomnianymi już 47 rycinami i 6 zdjęciami elektroforegramów oraz zebrano w 16 tabelach. Doktorant uzyskał wyniki będące efektem przeprowadzenia dwóch doświadczeń. Pierwsze doświadczenie polegało na zbadaniu polimorfizmów genów *FABP4*, *PPAR α* , *PPAR γ* i *SCD* u 5 ras owcy domowej, przy czym za materiał do analiz posłużyła krew obwodowa 2-3-letnich zwierząt. Natomiast doświadczenie drugie zostało wykonane w celu zbadania wpływu rasy, wieku i diety na poziom ekspresji wybranych genów w takich tkankach jak: wątroba, mięsień najdłuższy grzbietu oraz mięsień dwugłowy uda. Ponadto, u zwierząt należących do rasy ile de france oraz rasy owca kołudzka Doktorant określił profile zawartości kwasów tłuszczowych. Otrzymane wyniki zostały opisane w odpowiedni sposób, adekwatnie do rycin, elektroforegramów i tabel. W odniesieniu do rycin ilustrujących względny poziom ekspresji genów tj. rycin 5.36-5.47 sugerowałabym uzupełnienie opisu o stwierdzenie, że ekspresja poszczególnych genów była normalizowana do ekspresji genów referencyjnych tj. *GAPDH* względnie *RPS2*, tak jak to zostało podane w rozdziale MATERIAŁ I METODY. W przeciwnym razie mniej doświadczony czytelnik może odnieść wrażenie, że np. na rycinie 5.36 brak różnic między zwierzętami 3-miesięcznymi i 3-letnimi w ekspresji *FABP4* badanej w mięśniach oznacza brak różnic między poziomem ekspresji *FABP4* i poziomem ekspresji genu referencyjnego. Innym sposobem byłoby dodanie na rycinie kolumn przedstawiających ekspresję genu referencyjnego, ale wówczas ilustracja byłaby mniej klarowna, co przypuszczalnie brał pod uwagę Doktorant decydując się na wariant ryciny bez genu referencyjnego.

Rozdziały DYSKUSJA, PODSUMOWANIE oraz STWIERDZENIA I WNIOSKI obejmują łącznie 29 stron rozprawy. Dyskusja otrzymanych wyników została przeprowadzona w sposób jasny i kompetentny z uwzględnieniem najnowszej literatury w dziedzinie badań. Autor wykazał u wszystkich badanych ras owcy domowej brak

zmienności w genie *PPARα*. W odniesieniu do genu *FABP4*, największe zróżnicowanie genetyczne cechowało rasę suffolk. Z kolei w genie *SCD*, polimorfizm pojedynczego nukleotydu c.*1116A>G był skorelowany z konstytucją ciała i typem użytkowym charakterystycznym dla ras mięsnych suffolk i ile de france. Autor wykazał, że wraz z wiekiem zwierząt spada ekspresja *PPARα* i *PPARγ*, ale rośnie ekspresja *FABP4* i *SCD*, która jest skorelowana ze wzrostem zawartości kwasów tłuszczowych, palmitynowego i oleopalmitynowego, w tłuszczu śródmięśniowym badanych mięśni. Ponadto, Doktorant w interesujący sposób wyjaśnia wpływ diety wzbogaconej w kwas linolenowy dostępnej *ad libitum*, ale nie spożywanej w sposób normowany, na wzrost ekspresji *FABP4*, *PPARγ* i *SCD* w tkance mięśniowej. Formuluje wnioski w sposób przemyślany i klarowny.

W tekście rozprawy znalazło się kilka drobnych błędów: str. 12, wiersz 1 – jest WAT zamiast BAT, str. 15, wiersz 18 - jest OH zamiast CH₃, str. 31, wiersz 20 – Alzheimerera, str. 65 - czterokrotnie w następujących po sobie zdaniach pojawia się wyraz „następnie”, str. 153, wiersz 22 – dwukrotnie tuż po sobie pojawia się wyraz „spożycie”, str. 156, wiersz 14 – Kluczowym argument...

WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi istotny wkład w poznanie wariantów polimorficznych genów związanych z przemianą kwasów tłuszczowych u owcy domowej, co wykazano w odniesieniu do *FABP4*, *PPARγ* i *SCD*, ale nie *PPARα*. Mutacja c.*945G>A w genie *SCD* owcy domowej została opisana po raz pierwszy. Szczególna wartość wykonanych badań polega na: a) identyfikacji polimorfizmu genów *FABP4*, *PPARγ* i *SCD*, b) ustaleniu specyficznych zależności między ekspresją poszczególnych genów w tkance mięśniowej i wątrobie a wiekiem zwierząt, c) stwierdzeniu braku korelacji między poziomem ekspresji wybranych genów a rasą owiec, a także d) wykazaniu wpływu diety bogatej w PUFA na ekspresję *FABP4*, *PPARγ* i *SCD* oraz na zawartość PUFA n-3 i n-6 w tłuszczu śródmięśniowym u zwierząt żywionych *ad libitum*, ale nie u zwierząt żywionych w sposób normowany. Autor rozprawy włożył wiele pracy i wysiłku w wykonanie czasochłonnych i trudnych pomiarów i analiz. Wyniki uzyskane przy użyciu nowoczesnych metod badawczych z wykorzystaniem materiału biologicznego pozyskanego od dużych zwierząt hodowlanych są wysoce oryginalne. Mają one znaczenie nie tylko poznawcze, ale też potencjalnie użytkowe pozwalając na implementację wiedzy z zakresu genomiki, transkryptomiki i nutrigenomiki w selekcję zwierząt hodowlanych o najbardziej pożądanym cechach użytkowych.

Rozprawę doktorską Pana magistra inż. Mirosława Kucharskiego pt. „Zmienność genetyczna w *loci* wybranych genów warunkujących przemiany kwasów tłuszczowych u owcy domowej (*Ovis aries*)” oceniam bardzo wysoko, a nieliczne uwagi krytyczne nie umniejszają merytorycznej oceny pracy. Zważywszy że liczba zastosowanych metod i technik badawczych z obszaru biologii molekularnej, genetyki, i biochemii, a także zakres badań obejmujący doświadczenia na dużych zwierzętach hodowlanych przewyższają zwyczajowe wymogi prac doktorskich, składam wniosek o wyróżnienie rozprawy. Rozprawa doktorska magistra inż. Mirosława Kucharskiego spełnia wymagania określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w zakresie Sztuki (Dz. Ustaw z 2003 r., Nr 65 poz. 595., Dz. Ustaw z 2005 r., Nr 164, poz. 1365, Dz. Ustaw z 2011 r., Nr 84, poz.455). Wnioskuje o dopuszczenie magistra inż. Mirosława Kucharskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 4 czerwca 2017



dr hab. Małgorzata Kajta