

Załącznik II

---

# AUTOREFERAT

---

Dr inż. Artur Gurgul  
Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy  
Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt  
Ul. Krakowska 1, 32-083 Balice

---

*[artur.gurgul@izoo.krakow.pl](mailto:artur.gurgul@izoo.krakow.pl)*

**1. DANE PERSONALNE**

Imię i nazwisko: Artur Gurgul  
Data urodzenia: 11.01.1979  
Miejsce urodzenia: Kraków  
Miejsce pracy: Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy  
ul. Sarego 2  
31-047 Kraków  
Dane kontaktowe: Instytut Zootechniki PIB  
ul. Krakowska 1  
32-083 Balice  
tel. 666-081-309  
e-mail: artur.gurgul@izoo.krakow.pl

**2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE**

21.06.2004 Akademia Rolnicza im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, tytuł  
magistra inżyniera zootechniki w zakresie hodowli zwierząt  
02.03.2011 Instytut Zootechniki – Państwowy Instytut Badawczy, stopień  
naukowy doktora nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika

**3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH**

Obecnie Instytut Zootechniki – Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Biologii  
Molekularnej Zwierząt, adiunkt  
2013- 2017 Instytut Zootechniki – Państwowy Instytut Badawczy, Samodzielna  
Pracownia Genomiki/Dział Genomiki i Biologii Molekularnej Zwierząt,  
adiunkt  
2011- 2013 Instytut Zootechniki – Państwowy Instytut Badawczy, Samodzielna  
Pracownia Genomiki, zootechnik  
2005 – 2011 Instytut Zootechniki – Państwowy Instytut Badawczy, Dział Immuno-  
i Cytogenetyki Zwierząt, zootechnik  
2005 - 2005 Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Wydział Ogrodnictwa, Katedra  
Uprawy Roli i Nawożenia Roślin Ogrodniczych, starszy technik

**4. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCEGO Z ART. 15 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 ROKU O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ. U. NR 65, POZ. 595 ZE ZM.)**

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl pięciu, powiązanych tematycznie, oryginalnych prac naukowych, opublikowanych w czasopismach naukowych znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR) o łącznej punktacji IF = 7,878 i MNiSW/KBN = 120 pkt.

**a) Tytuł osiągnięcia naukowego:**

„Wykorzystanie narzędzi genomiki w badaniach nad zmiennością genomu i różnicowaniem genetycznym wybranych ras bydła”.

**b) Spis publikacji wchodzących w skład osiągnięcia (autorzy, rok wydania, tytuły publikacji, nazwa wydawnictwa):**

Lp.	Publikacja	IF <sup>a</sup>	KBN <sup>b</sup>
P1	Gurgul A, Rubiś D, Ząbek T, Żukowski K, Pawlina K, Semik E, Bugno-Poniewierska M. 2013. The evaluation of the usefulness of pedigree verification-dedicated SNPs for breed assignment in three polish cattle populations. Mol Biol Rep. 40(12):6803-6809.	1,958	20
	Wkład indywidualny: 70% Opracowanie koncepcji i metodyki badań, udział w analizach molekularnych, wiodący udział w statystycznym opracowaniu danych, sformułowanie wniosków, przygotowanie manuskryptu.		
P2	Gurgul A, Pawlina K, Frys-Żurek M, Bugno-Poniewierska M. 2015. Identification of differential selection traces in two Polish cattle breeds. Anim Sci J. 86(1):17-24.	1,045	25
	Wkład indywidualny: 75% Opracowanie koncepcji i metodyki badań, udział w analizach molekularnych, wiodący udział w statystycznym opracowaniu danych, sformułowanie wniosków, przygotowanie manuskryptu.		
P3	Gurgul A, Jasielczuk I, Szmatoła T, Pawlina K, Ząbek T, Żukowski K, Bugno-Poniewierska M. 2015. Genome-wide characteristics of copy number variation in Polish Holstein and Polish Red cattle using SNP genotyping assay. Genetica 143(2):145-155.	1,343	20
	Wkład indywidualny: 65% Opracowanie koncepcji i metodyki badań, udział w analizach molekularnych, wiodący udział w statystycznym opracowaniu danych, sformułowanie wniosków, przygotowanie manuskryptu.		
P4	Gurgul A, Szmatoła T, Ropka-Molik K, Jasielczuk I, Pawlina K, Semik E, Bugno-Poniewierska M. 2016. Identification of genome-wide selection signatures in the Limousin beef cattle breed. J Anim Breed Genet. 133(4):264-276.	1,877	35

	Wkład indywidualny: 65% Opracowanie koncepcji i metodyki badań, udział w analizach molekularnych, wiodący udział w statystycznym opracowaniu danych, sformułowanie wniosków, przygotowanie manuskryptu.		
<b>P5</b>	<b>Gurgul A</b> , Szmatoła T, Topolski P, Jasielczuk I, Żukowski K, Bugno-Poniewierska M. 2016. The use of runs of homozygosity for estimation of recent inbreeding in Holstein cattle. <i>J Appl Genet.</i> 57(4):527-530.	1,655	20
	Wkład indywidualny: 55% Opracowanie koncepcji badań, udział w analizach molekularnych, udział w statystycznym opracowaniu danych, sformułowanie wniosków, przygotowanie manuskryptu.		
	<b>Razem</b>	<b>7,878</b>	<b>120</b>

<sup>a-</sup> Współczynnik Impact Factor (IF) wg bazy Journal Citation Reports (JCR) zgodny z rokiem ukazania się pracy

<sup>b-</sup> liczba punktów wg wykazu czasopism naukowych MNiSW zgodna z rokiem ukazania się pracy

**Oświadczenia współautorów przedstawionych powyżej prac naukowych (P1-P5) wraz z określeniem ich indywidualnego udziału wykazano w załączniku nr VI.**

**c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.**

Dokonujący się na przestrzeni ostatnich lat postęp w dziedzinie genetyki molekularnej związany z rozwojem nowoczesnych, wysokowydajnych technik analiz DNA oraz metod obliczeniowych pozwalających na analizowanie wielkoskalowych danych generycznych, zainicjował lawinowy przyrost informacji na temat zmienności genomów różnych gatunków zwierząt, w tym także zwierząt gospodarskich. Zastosowanie wysokowydajnych technik sekwencjonowania następnej generacji pozwoliło na identyfikację ogromnej liczby polimorfizmów DNA (głównie polimorfizmów pojedynczych nukleotydów, SNP). SNP stanowią bogate źródło wysokiej jakości markerów generycznych, użytecznych dla celów prowadzenia oceny genomowej, identyfikacji *loci* cech ilościowych, badań asocjacyjnych czy analiz z zakresu genomiki populacji, obejmujących zmiany zachodzące w genomach pod wpływem różnych czynników takich jak np.: selekcja, inbred, krzyżowanie czy zjawiska demograficzne (związane ze zmianami liczebności populacji) (Helyar i wsp. 2011). Tego typu analizy wydają się mieć szczególne znaczenie w hodowli zwierząt gospodarskich, w której zmienność genetyczna i struktura populacji są silnie uzależnione od celowych działań człowieka zmierzających do doskonalenia generycznego poszczególnych populacji (w tym wykorzystania biotechnik) oraz od aktualnych trendów panujących w produkcji zwierzęcej. Wykorzystanie wielkoskalowych analiz genetycznych znalazło szczególne zastosowanie w hodowli bydła mlecznego, dla którego wprowadzono program selekcji genomowej, umożliwiający ocenę wartości hodowlanej zwierzęcia w oparciu o genotypy tzw. genomowego panelu markerów SNP (Hayes i wsp., 2009). Genomowe panele markerów SNP znalazły dalsze zastosowanie w szerokiej gamie zagadnień badawczych dotyczących m. in.

zróznicowania genetycznego poszczególnych ras, identyfikacji regionów genomu noszących ślady oddziaływania presji selekcyjnej, poszukiwania nowych źródeł zmienności genetycznej czy oceny wsobności populacji w oparciu o markery genetyczne (Howard i wsp., 2017). Wspomniane analizy z zakresu genomiki populacji wybranych ras bydła, mające charakter zarówno badań podstawowych jak i aplikacyjnych zmierzających do opracowania narzędzi molekularnych dla hodowli bydła, były realizowane w kilku etapach ujętych w pięciu poniższych oryginalnych pracach naukowych będących przedmiotem osiągnięcia naukowego:

**P1. Gurgul A, Rubiś D, Ząbek T, Żukowski K, Pawlina K, Semik E, Bugno-Poniewierska M. 2013. The evaluation of the usefulness of pedigree verification-dedicated SNPs for breed assignment in three polish cattle populations. Mol Biol Rep. 40(12):6803-6809.**

### **Cel naukowy**

Zróznicowanie genetyczne poszczególnych ras ma ogromne znaczenie dla zachowania bioróżnorodności gatunku i ochrony jego puli genowej. Różnorodność ras oraz ich specjalizacja w określonym typie produkcji pozwala także na uzyskiwanie zróznicowanego produktu zwierzęcego, przystosowanego do oczekiwań konsumenta. W związku z faktem, że w obecnej produkcji zwierzęcej rasa bydła od jakiej pozyskuje się poszczególne produkty jest często powiązana z unikalnymi cechami produktu oraz jego jakością, określenie pochodzenia rasowego poszczególnych surowców zwierzęcych może mieć istotne znaczenie w procesie zarządzania i certyfikacji produkcji zwierzęcej. Zróznicowanie poszczególnych ras na poziomie DNA dostarcza cennych narzędzi dla kontroli jakości i identyfikacji pochodzenia produktów zwierzęcych (Negrini i wsp., 2009). W związku z tym, celem podjętych badań było określenie możliwości wykorzystania podzbioru 120 markerów SNP, dedykowanych do kontroli rodowodów i identyfikacji osobniczej, do przypisania poszczególnych zwierząt do ras z których się wywodzą. Rozróżnianie ras bydła jest jednym z aktualnych problemów genetyki molekularnej, który wciąż wymaga dalszych badań i rozwoju stosowanej metodologii. Pomimo, że dotychczas opracowano kilka podejść statystycznych umożliwiających takie wykorzystanie markerów SNP, uzyskane wyniki są silnie uzależnione od zróznicowania genetycznego określonych populacji i siły dyskryminacji wykorzystanych markerów (Dalvit i wsp., 2008). Prezentowane badania były więc pierwszą próbą określenia zdolności dyskryminacyjnych panelu markerów SNP dedykowanego do kontroli rodowodów u bydła w aspekcie rozróżniania ras w oparciu o markery molekularne.

### **Otrzymane wyniki**

Badania przeprowadzono w oparciu o materiał biologiczny pozyskany od 741 zwierząt należących do trzech ras bydła: polskiego holsztyńsko-fryzyjskiego (HO), polskiego czerwonego (RP) oraz Limousin (LM). Genotypy dla podzbioru 120 SNP rekomendowanych do kontroli rodowodów zostały oznaczone z wykorzystaniem mikromacierzy genotypujących firmy Illumina - BovineSNP50 lub BovineLD BeadChip. Testy alokacji poszczególnych osobników do ras ich pochodzenia przeprowadzono z wykorzystaniem metody bayesowskiej według Rannala i Mountain (Rannala i Mountain, 1997) oraz metody opartej na różnicach w częstości alleli według Paetkau i wsp. (1995). W celu oceny zdolności poszczególnych

algorytmów do przypisywania osobników do poszczególnych ras, przeprowadzono dwa niezależne doświadczenia. W pierwszym, prawdopodobieństwo przypisania poszczególnych osobników do ras pochodzenia zostało ocenione na zbiorze zwierząt stanowiącym populację referencyjną, wraz z 1000 symulowanych genotypów. W drugim, 15-21 osobników (w zależności od rasy) wykluczono ze zbioru referencyjnego i poddano procedurze przyporządkowania do ras w oparciu o profil genetyczny. Przyjęto dwa kryteria prawidłowego przypisania do rasy, gdzie w przypadku wariantu rygorystycznego za prawidłowo przypisane uznano zwierzęta, które miały tylko jedno najlepsze, statystycznie istotne dopasowanie do rasy, natomiast w przypadku kryterium mniej rygorystycznego, rozpatrywano przypisania z najniższą wartością prawdopodobieństwa popełnienia błędu I rodzaju.

W przypadku obliczeń prowadzonych z wykorzystaniem symulowanych genotypów, w podejściu rygorystycznym, obydwie wykorzystane algorytmy dały słabe wyniki w zakresie rozróżniania ras, szczególnie w przypadku ras RP i LM. Obie metody były w stanie przydzielić tylko od 38,3% (rasa RP) do 76,5% (rasa HO) zwierząt do rasy ich pochodzenia (z przeciętnym prawdopodobieństwem 0,5122 dla wszystkich ras). Gdy zastosowano mniej rygorystyczne kryteria kwalifikacyjne, obie metody dały obiecujące wyniki, gdzie od 93,3% (RP) do 98,8% (HO) zwierząt zostało przydzielonych do prawidłowej rasy z prawdopodobieństwem prawidłowego przypisania o 20% wyższym niż drugie najlepsze dopasowanie.

W przypadku obliczeń prowadzonych w oparciu o podzbiór osobników wykluczonych z populacji referencyjnej i mniejszej rygorystyczności klasyfikacji wyników, dla ras HO i LM, wszystkie zwierzęta zostały prawidłowo przypisane do właściwej rasy. Tylko dla rasy RP, zaobserwowano mniejszą zgodność wyników, którą oszacowana na 80,9% prawidłowych przypisów przy wykorzystaniu metody bayesowskiej i 95,2% poprawnych przydziałów wg. metody opartej na częstości alleli.

### **Omówienie wykorzystania wyników**

W niniejszej pracy podjęto próbę rozróżnienia ras w oparciu o markery molekularne pomiędzy trzema populacjami polskiego bydła na podstawie analizy genotypów SNP polecanych do kontroli rodowodów. Problem ten jest aktualny zwłaszcza w związku z rosnącym zainteresowaniem wykorzystaniem tych markerów w rutynowej kontroli rodowodów i identyfikacji osobniczej. Rutynowe zastosowanie tych markerów w hodowli zaowocuje dostępnością dużych zbiorów danych obejmujących genotypy zwierząt gromadzone przez instytucje hodowlane lub laboratoria genetyki molekularnej, które będą mogły być dalej wykorzystywane jako populacje referencyjne dla porównań i ewentualnego przypisywania zwierząt do ich ras pochodzenia, w ramach oceny zgodności produktów pochodzenia zwierzęcego z deklaracją producenta. W niniejszych badaniach wykazano, że panel markerów SNP wykorzystywany do kontroli rodowodów u bydła nie jest najlepszym narzędziem dla celów rozróżniania ras, jednak jego zastosowanie daje pewne możliwości w tym zakresie i jest silnie uzależnione od zmienności między- i wewnątrz rasowej oraz od stopnia genetycznego skonsolidowania analizowanych ras. Badania te są kontynuowane i

zmierzają do utworzenia panelu markerów mającego duże zdolności dyskryminacyjne w przypadku szeregu ras bydła utrzymywanych w Polsce.

**P2. Gurgul A, Pawlina K, Frys-Żurek M, Bugno-Poniewierska M. 2015. Identification of differential selection traces in two Polish cattle breeds. Anim Sci J. 86(1):17-24.**

### **Cel naukowy**

Historia hodowli bydła jest ściśle powiązana z intensywną sztuczną selekcją, która doprowadziła do wykształcenia się poszczególnych ras czy typów użytkowych o ściśle określonej charakterystyce produkcji. Kierunkowa selekcja, polegająca na wyborze na rodziców przyszłego pokolenia zwierząt najlepszych w odniesieniu do stosowanego kryterium selekcyjnego, prowadzi do zmian w częstości alleli genów odpowiedzialnych za kształtowanie poszczególnych cech fenotypowych. Zmiany te zmierzają w kierunku utrwalenia korzystnych wariantów genów w selekcionowanych populacjach i mogą być identyfikowane poprzez analizę potencjalnie neutralnych, sąsiadujących w genomie markerów będących w nierównowadze sprzężeń z funkcjonalnym *locus* (Qanbari i wsp., 2010). Porównanie częstości alleli takich markerów pomiędzy poszczególnymi rasami bydła pozwala na identyfikację regionów genomu podlegających różnicowej presji selekcyjnej, potencjalnie wskazujących lokalizację genów odpowiedzialnych za cechy produkcyjne oraz inne dziedziczne cechy fenotypowe różnicujące badane rasy (Porto-Neto i wsp., 2013). Obecnie zarówno w Polsce jak i na świecie, wiodącą rasą w zakresie produkcji mlecznej jest rasa holsztyńsko-fryzyjska. Jednakże w celu zachowania bioróżnorodności gatunku rozpoczęto realizację programów ochrony zasobów genetycznych, w ramach których, uwzględniono m. in. bydło rasy polskiej czerwonej. Bydło to charakteryzuje się szeregiem cech, które uległy silnej degradacji u intensywnie selekcionowanych ras bydła i obejmują przede wszystkim: odporność na niekorzystne warunki środowiskowe, zdrowotność, dobrą płodność czy wysoką wartość biologiczną mleka. W związku z tym, w niniejszej pracy pojęliśmy się identyfikacji sygnatur różnicowej selekcji pomiędzy komercyjną rasą holsztyńsko-fryzyjską oraz zachowawczą polską czerwoną w celu identyfikacji potencjalnych *loci* genów odpowiedzialnych za cechy fenotypowe różnicujące badane rasy.

### **Otrzymane wyniki**

Materiał do badań stanowiło genomowe DNA wyizolowane z pełnej krwi lub nasienia 416 losowo wybranych osobników rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej (HO) oraz 292 rasy polskiej czerwonej. DNA poddano analizie z wykorzystaniem mikromacierzy genotypujących firmy Illumina obejmujących sondy dla 54 609 SNP, równomiernie rozmieszczonych w genomie bydła ze średnim dystansem około 49,4 kpz. Dla każdej populacji obliczono częstości alleli i bezwzględne różnice w częstościach alleli pomiędzy populacjami dla każdego SNP. Następnie markery zostały uszeregowane zgodnie z pozycjami genomowymi i w celu uwzględnienia stochastyczności w zmienności pomiędzy loci, obliczono średnią różnicę w częstości alleli dla 10 sąsiadujących SNP za pomocą średniej ruchomej. Średnią ruchomą obliczono dla 43 056 okien na wszystkich 29 autosomach bydła. Zidentyfikowane regiony genomu z najwyższą wartością różnic we frekwencji alleli ( $>0,55$ ) zostały

przenalizowane pod kątem kodowanych przez nie genów oraz kolokalizacji ze znanymi *loci* cech ilościowych (QTL).

Zidentyfikowane regiony o największych różnicach w częstości alleli stanowiły 19 unikalnych segmentów genomu rozlokowanych na 12 różnych autosomach. Łącznie regiony te obejmowały 9,6 Mbp a rozmiar pojedynczych regionów mieścił się w zakresie od 329,9 do 822,4 kbp. W obrębie zidentyfikowanych regionów genomu, stanowiących potencjalnie sygnały różnicowej selekcji, zidentyfikowano 55 genów adnotowanych w bazie danych RefSeq. Spośród tych genów 60% zaklasyfikowano jako zaangażowane w procesy metaboliczne, 20% w procesy komórkowe, a pozostałe w sygnalizację komórkową, aktywność transportową, funkcjonowanie układu odpornościowego, reakcję na bodziec, procesy rozwojowe czy procesy związane z reprodukcją. Zidentyfikowane regiony genomu pokrywały się z 284 znanymi QTL. Czterdzieści siedem z nich było związanych z wydajnością i procentem tłuszczu w mleku, 39 z wydajnością i procentem białka, 11 z liczbą komórek somatycznych, 15 z wydajnością mleka, 18 z masą ciała w różnym wieku i dziewięć z masą tuszy.

### Omówienie wykorzystania wyników

W omawianych badaniach zidentyfikowano regiony genomu, które różnicują dwie, fenotypowo odmienne rasy bydła: wysokoprodukcyjną rasę holsztyńsko-fryzyjską oraz posiadającą cechy ras prymitywnych, rasę polską czerwoną. Regiony te mogą wskazywać lokalizację zarówno wariantów ulegających pozytywnej selekcji w poszczególnych rasach, jak również lokalizację genów odpowiedzialnych za pożądane cechy fenotypowe ras zachowawczych. Otrzymane wyniki dają silne podstawy do dalszych badań mających na celu identyfikację genów determinujących cenne cechy funkcjonalne zachowawczych ras bydła.

**P3. Gurgul A, Jasielczuk I, Szmatoła T, Pawlina K, Ząbek T, Żukowski K, Bugno-Poniewierska M. 2015. Genome-wide characteristics of copy number variation in Polish Holstein and Polish Red cattle using SNP genotyping assay. *Genetica* 143(2):145-155.**

### Cel naukowy

Obok polimorfizmów pojedynczych nukleotydów w genomach zwierząt istnieją także inne typy polimorfizmu DNA będące źródłem naturalnej zmienności genetycznej. Jednym z nich są tzw. warianty liczby kopii DNA (ang. copy number variants, CNVs). CNVs powstają głównie w wyniku błędów replikacji oraz niehomologicznego łączenia końców DNA w procesie rekombinacji i stanowią submikroskopowe (powyżej 1 kbp) delecje, insercje lub amplifikacje sekwencji nukleotydowej (Conrad i wsp., 2010). Ich znacznie biologiczne wynika z faktu, że mogą one obejmować całe geny lub istotne elementy funkcjonalne genów, jak promotory czy enhancery i przez to wpływać na poziom syntezy poszczególnych mRNA (Orozco i wsp., 2009). Obok potencjalnego patogennego efektu, CNVs odpowiadają za naturalne zróżnicowanie sekwencji DNA, stanowiące dodatkowe źródło zmienności genetycznej. Zmiany tego typu w skali genomu mogą być identyfikowane m. in. za pomocą mikromacierzy genotypowych (SNP), gdzie przedmiotem analiz jest nie sam genotyp SNP lecz intensywność i zakres emisji światła przez poszczególne znakowane fluorescencyjne sondy (Wang i wsp., 2007). W populacjach bydła, ten rodzaj genetycznej zmienności



pozostaje wciąż niedostatecznie zbadany, a badania koncentrujące się na wykrywaniu nowych strukturalnych wariantów genomu w różnych populacjach bydła mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia różnorodności ras i genetycznych podstaw cech produkcyjnych. W związku z tym, za cel badań przyjęto określenie częstości i charakteru zmian typu CNV u wybranych polskich ras bydła w oparciu o dane pochodzące z macierzy genotypowych, jako wstęp do poszukiwania nowych markerów i źródeł zmienności genetycznej u bydła domowego.

### Otrzymane wyniki

Przedmiotem analiz były parametry intensywności świecenia poszczególnych sond na mikromacierzach genotypowych BovineSNP50 firmy Illumina oznaczone dla 859 sztuk bydła rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej oraz 301 rasy polskiej czerwonej. Do identyfikacji CNV wykorzystano algorytm `cnvPartition v3.2.0` (Illumina) analizujący znormalizowaną intensywność absolutną (Log R ratio) oraz alleliczną (B allele frequency) dla każdego SNP i porównujący je z wartościami oczekiwanymi dla różnych liczb kopii regionów genomu. Minimalną wielkość regionu CNV ustalono na 3 sąsiadujące SNP. Przed identyfikacją CNV parametry intensywności poprawiono pod kątem zmienności w zawartości nukleotydów GC w różnych partiach genomu, na podstawie liniowej regresji intensywności absolutnej względem zawartości par CG w sekwencjach sond dla poszczególnych SNP.

U badanych 859 zwierząt rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej wykryto łącznie 648 wariantów, które zredukowano do 215 unikalnych autosomalnych CNV. Znaczną część zidentyfikowanych CNV (68%), obserwowano tylko raz w populacji. Pozostałe zidentyfikowane warianty miały charakter rzadkich zmian polimorficznych i nie przekraczały frekwencji 8% w badanej populacji. Wśród zidentyfikowanych CNV najczęściej obserwowane były homo- lub heterozygotyczne delecje (52% wszystkich CNV) lub amplifikacje do trzech kopii (44,2%). Wielkość pojedynczych CNV mieściła się w zakresie od 65 kpz do 16,7 Mpz, przy średniej wielkości 1,49 Mpz i medianie równej 572 kpz. Mediana wielkości delecji i amplifikacji różniła się i została oszacowana odpowiednio na 231 kpz i 1,6 Mpz. Średnia wielkość amplifikacji była około trzy razy wyższa niż w przypadku delecji i została oszacowana na 2,2 Mpz.

U 301 zwierząt rasy polskiej czerwonej, stwierdzono obecność 62 unikalnych CNV. Wariantów liczby kopii nie wykryto u 181 spośród przebadanych zwierząt. Średnio 1,17 CNV wykryto u pozostałych zwierząt (od 1 do 4 w poszczególnych próbkach). Czterdzieści sześć (74,2%) spośród zidentyfikowanych CNV wystąpiło raz w populacji. Frekwencja poszczególnych CNV w całej badanej populacji nie przekraczała 11,6%, w tym tylko siedem CNV występowało z częstością wyższą niż 1%. Około 58% zidentyfikowanych CNV stanowiły delecje, 37,1% amplifikacje do trzech kopii, a pozostałe CNV stanowiły amplifikacje do czterech kopii. Wielkość obserwowanych CNV u rasy polskiej czerwonej mieściła się w zakresie od 82 kb do 4,1 Mb, z średnią wielkością 757 kpz. Podobnie jak w populacji HO mediana wielkości amplifikacji była wyższa niż dla delecji (952 kpz vs. 257 kpz, odpowiednio). Dodatkowo, kilka dużych amplifikacji sprawiło, że średnią wielkość amplifikacji była prawie trzykrotnie wyższa niż delecji (1,19 Mpz vs. 438 kpz).

## Omówienie wykorzystania wyników

W trakcie badań określono charakter i stworzono mapę zmienności liczby kopii w genomach dwóch polskich ras bydła przy użyciu jednego z możliwych podejść metodologicznych polegających na analizie genomowego panelu markerów SNP. Stwierdzono, że wzorzec zmienności jest podobny u badanych ras bydła, jednakże częstość wariantów różni się pomiędzy tymi populacjami. Otrzymane wyniki zapewniły podstawy dla dalszych badań w tym zakresie i przyczyniły się do zwiększenia wiedzy na temat tego typu zmienności genetycznej u polskich ras bydła.

**P4. Gurgul A, Szmatoła T, Ropka-Molik K, Jasielczuk I, Pawlina K, Semik E, Bugno-Poniewierska M. 2016. Identification of genome-wide selection signatures in the Limousin beef cattle breed. J Anim Breed Genet. 133(4):264-276.**

## Cel naukowy

Omawiane wcześniej (P2) różnicowe sygnatury selekcji wskazują regiony genomu, w których pod wpływem różnicującej selekcji doszło do odmiennego utrwalenia wariantów genów pomiędzy dwoma populacjami różniącymi się poziomem cech fenotypowych. Metody statystyczne pozwalające na identyfikację takich różnicowych sygnatur bazują na analizach porównawczych pomiędzy populacjami i nie wymagają wyznaczania bazowych poziomów częstości alleli SNP, które często są trudne do określenia ze względu na występowanie zjawiska dryfu genetycznego. W przypadku analiz zmierzających do wykrycia śladów działania presji selekcyjnej w obrębie poszczególnych populacji, bazowanie wyłącznie na częstości alleli może doprowadzić do fałszywych wniosków, ze względu na brak wiarygodnej, porównawczej częstości alleli, w odniesieniu do której, można identyfikować systematyczne odchylenia wskazujące na działanie presji selekcyjnej. Rozwiązaniem w tym zakresie wydają się być metody polegające na porównaniu charakterystyki i częstości bloków haplotypowych w obrębie pojedynczej populacji, w celu wskazania miejsc genomu, w których istnieją długie i częste haplotypy, które prawdopodobnie podlegają działaniu presji selekcyjnej. Założeniem będącym podstawą tych metod jest fakt, że filogenetycznie niedawno powstała mutacja, która podlega presji selekcyjnej (jest korzystna dla selekcionowanej cechy) podlega szybkiemu wzrostowi częstości w populacji a powiązany z nią haplotyp jest długi, ze względu na stosunkowo wolne działanie mechanizmów rekombinacyjnych. Aby uwzględnić lokalną częstość rekombinacji, która może różnić się dla poszczególnych chromosomów i ich regionów, wielkości haplotypów są porównywane z innymi, równie częstymi blokami haplotypowymi na dystansie 1 cM (Sabeti i wsp., 2002). Takie podejście pozwala poprawić otrzymane wyniki względem lokalnej częstości rekombinacji i precyzyjnie wskazać miejsca genomu podlegające presji selekcyjnej, które prawdopodobnie obejmują geny odpowiedzialne za kształtowanie poszczególnych cech fenotypowych. W związku z tym, za cel pracy przyjęto identyfikację sygnatur selekcji u dotychczas (w roku publikacji) nie analizowanej pod tym kontem rasy bydła Limousin, w oparciu o genomowy panel markerów SNP oraz analizę względnej rozszerzonej homozygotyczności haplotypów w celu wskazania regionów genomu obejmujących geny kandydujące dla cech selekcionowanych u tej rasy.

## Otrzymane wyniki

Badania przeprowadzono w oparciu materiał biologiczny pozyskany od 201 losowo wybranych osobników rasy Limousin, dla których ustalono genotypy genomowego panelu 54 tys. markerów SNP. Genotypy te zostały poddane analizie fazy sprzężenia oraz imputacji. Tak opracowane geotypy zostały dalej wykorzystane do identyfikacji wariantów haplotypowych w poszczególnych *loci* (rdzeni haplotypowych). Następnie oszacowano sprzężenie pomiędzy poszczególnymi rdzeniami haplotypów a kolejnymi *loci* wg wzrastającego dystansu w obrębie chromosomu. W ten sposób określono rozszerzoną homozygotyczność haplotypów (ang. Extended Haplotype Homozygosity, EHH). Rdzenie haplotypów, o wysokiej wartości EHH oraz wysokiej częstości w populacji wskazują mutacje, których częstość w populacji wzrosła szybciej pod wpływem selekcji, niż wynikałoby to z teorii neutralnej (Sabeti i wsp., 2002). Aby uwzględnić różnice w częstości rekombinacji w różnych miejscach genomu, obliczono relatywną rozszerzoną homozygotyczność haplotypów na dystansie do 1 cM od rdzeni haplotypów.

Na podstawie przeprowadzanych analiz u badanego bydła Limousin wykryto 3 818 rdzeni haplotypów obejmujących 450,3 Mpz sekwencji genomowej (18% autosomalnego genomu). Średnia wielkość rdzeni haplotypów wynosiła 117,9 kb ( $\pm 105,56$ ) i mieściła się w zakresie od 9,8 kbp do 1,55 Mpz. Dla wszystkich rdzeni haplotypów przeprowadzono 29 678 testów rozszerzonej homozygotyczności (średnio 7,8 na haplotyp). Spośród nich, 173 wykazywało wartości prawdopodobieństwa testu REHH  $< 0,01$ . Przy poziomie istotności  $p < 0,001$ , zidentyfikowano 40 regionów genomu podlegających presji selekcyjnej, spośród których największa liczba zlokalizowana była na chromosomie 14. W obrębie najsilniejszych sygnałów różnicowej sekcji zidentyfikowano 177 genów, spośród których znacząca część zaangażowana była w procesy rozwojowe, różnicowanie, proliferację komórek i metabolizm białek. Potwierdzono także, że gen miostatyny (*MSTN*) ma silny związek cechami mięsności selekcionowanymi u bydła rasy Limousin.

## Omówienie wykorzystania wyników

Przeprowadzone badania były jednymi z pierwszych identyfikujących sygnatury selekcji u bydła rasy Limousin i pozwoliły na stworzenie genomowej mapy oddziaływania presji selekcyjnej u tego bydła. Badania pozwoliły także na wskazanie szeregu genów kandydujących prawdopodobnie odpowiedzialnych za cechy mięsne selekcionowane u badanej rasy bydła. Badania dały silne podstawy do formułowania szeregu hipotez badawczych odnośnie genetycznego podłoża i regulacji ekspresji cech mięsnych bydła rasy Limousin.

**P5. Gurgul A, Szmatoła T, Topolski P, Jasielczuk I, Żukowski K, Bugno-Poniewierska M. 2016. The use of runs of homozygosity for estimation of recent inbreeding in Holstein cattle. J Appl Genet. 57(4):527-530.**

## Cel naukowy

Istotnym czynnikiem genetycznym, który musi podlegać ścisłej kontroli w stadach zwierząt hodowlanych jest inbred, będący wynikiem kojarzenia wsobnego. Chów wsobny

proceeds to an increase in homozygosity of the population, which can be associated with both positive and negative genetic effects. The most important negative effect of inbreeding is „depression of inbreeding” which is a result of the expression of recessive genes and is manifested by a decrease in survival, fertility and productivity of animals (Charlesworth and Willis, 2009). The evaluation of the level of inbreeding of individual animals is based on statistical expectations, that a given animal inherits from its mother and father the same alleles derived from a common ancestor. Calculations of the inbreeding coefficient are based on pedigree records, but the depth and completeness of pedigrees is not always sufficient for taking into account all kinship relationships, especially those that occurred in the period preceding the registration of pedigrees (Carothers et al., 2006). An alternative for calculations based on pedigrees is the use of genomic panels of SNP markers, which allow for the identification of identical alleles that arose as a result of the random combination of the same variants of genes in a given animal, as well as the identification of alleles that are a result of inheritance from a common ancestor. A promising method in this area is the analysis of so-called runs of homozygosity (ROH), which are long segments of the genome, formed as a result of identical haplotypes inherited from a common ancestor (autozygotic). Both the size of these blocks and their frequency reflect the relatedness of the ancestors of a given animal, with the longer the run of homozygosity, the greater the probability that it is autozygotic and characteristic for a more recent kinship relationship (Purfield et al., 2012). In connection with this, in the mentioned work the possibility of using the inbreeding coefficient calculated based on ROH, as a useful measure of inbreeding in breeding and the determination of its relationship to other measures of inbreeding (genomic and calculated based on pedigrees) in the Polish Friesian cow breed was examined.

### Otrzymane wyniki

In the study, material from 298 randomly selected animals of the Polish Friesian cow breed was used. For the animals, genotypes were determined using a matrix containing probes for approximately 54 thousand SNP markers. After filtering the data for quality and polymorphism, for further studies a set of 42 449 SNP markers was used, distributed in the genome of the cow with an average distance of 57 233 bp ( $\pm 49 844$ ). Runs of homozygosity were identified based on parameters taking into account the level of genotyping errors observed when using the applied microarray, requiring a minimum of 15 adjacent homozygous SNPs in ROH and allowing for a single heterozygous SNP in ROH of length greater than 16 Mb. Inbreeding coefficients were estimated based on ROH ( $F_{ROH}$ ) calculated as the ratio of the sum of ROH lengths for a given animal to the size of the autosomal genome covered by SNP markers. The coefficient of relatedness based on the genomic matrix ( $F_{GRM}$ ) was calculated using the method proposed by VanRaden (2008), as the relatedness of an animal to itself, read from the diagonal of the G matrix. The classical inbreeding coefficient ( $F_{PED}$ ) was calculated based on pedigree data from 583 697 animals and 2 125 703

krów z wykorzystaniem modelu z grupami genetycznymi, zaproponowanego przez VanRaden'a (1992). Zgodność wyników otrzymanych z wykorzystaniem markerów molekularnych z wartościami współczynnika inbredu oznaczonymi na podstawie rodowodów, określono w oparciu o analizę korelacji.

W badanej populacji zidentyfikowano średnio 82,2 ( $\pm 13,7$ ) ROH u poszczególnych zwierząt (od 57 do 110). Średnia suma długości wszystkich ROH w przeliczeniu na zwierzę została oszacowana na 296,70 Mpz ( $\pm 73,56$ ), przy minimalnym i maksymalnym długości, odpowiednio 113,52 i 596,5 Mpz. Największą liczbę ROH obserwowano na chromosomie 1. Największe pokrycie przez ROH (w odniesieniu do długości chromosomu) stwierdzono na chromosomie 16 (13,6% wielkości chromosomu). Wartości  $F_{ROH}$  mieściły się w zakresie od 0,0453 do 0,2383, ze średnią wartością 0,1185 ( $\pm 0,0293$ ). Wartości  $F_{PED}$  były niższe i mieściły się w zakresie od 0,0002 do 0,0989, ze średnią wartością 0,0124 ( $\pm 0,0126$ ). Najniższą średnią wartość obserwowano dla  $F_{GRM}$  (-0,001;  $\pm 0,0661$ ), a współczynnik ten wynosił od -0,408 do 0,2963.

Najniższą korelację (0,243) zaobserwowano pomiędzy współczynnikami inbredu obliczonymi dla zwierząt z pięcioma generacjami zarejestrowanymi w rodowodach ( $F_{PED}$ ) i  $F_{ROH}$  obliczonym w oparciu o segmenty o długości powyżej 16 Mb. Najwyższą, ale nieistotną ( $p = 0,07$ ) korelację ( $R = 0,516$ ) uzyskano wykorzystując do obliczeń ROH o długości powyżej 8 Mb. Korelacje pomiędzy  $F_{ROH}$  i  $F_{PED}$  wykazywały tendencję wzrostową wraz ze wzrostem liczby pokoleń zarejestrowanych w rodowodowych i były najwyższe dla zwierząt z siedmioma pełnymi pokoleniami uwzględnionymi w danych rodowodowych.  $F_{GRM}$  wykazał słabą korelację z danymi rodowodowymi, na poziomie 0,022, i nie był dalej rozważny jako dobry estymator klasycznego współczynnika inbredu.

### **Omówienie wykorzystania wyników**

Wyniki prezentowanej pracy potwierdzają, że  $F_{ROH}$  może być przydatnym estymatorem indywidualnej autozygotyczności w populacjach bydła i może dać wgląd w poziom inbredu zwierząt, w przypadku gdy dane rodowodów zwierząt są niedostępne lub zawierają niedostateczną ilość informacji. Wyższa korelacja współczynnika  $F_{ROH}$  z klasycznym współczynnikiem inbredu w przypadku posiadania głębszej informacji rodowodowej, sugeruje, że  $F_{ROH}$  uwzględnia także dawne spokrewnienie przodków zwierząt, które mogło nie zostać odnotowane w ich rodowodach, przez co  $F_{ROH}$  wydaje się być lepszą miarą inbredu, szczególnie w populacjach o płytkiej informacji rodowodowej.

### **Podsumowanie**

Podsumowując, w ramach badań będących przedmiotem głównego osiągnięcia naukowego, poruszono szereg zagadnień z zakresu szeroko pojętej genomiki populacyjnej w odniesieniu do jednego z najważniejszych gatunków zwierząt gospodarskich jakim jest bydło. Omawiane badania obejmują kompleksową analizę, zarówno globalnego zróżnicowania genetycznego badanych ras bydła, jak również dotyczą zróżnicowania międzyosobniczego i poruszają istotne kwestie, takie jak molekularny wzorzec rasowy czy autozygotyczność genomów poszczególnych osobników. W ramach badań dokonano także szczegółowego opisu dotychczas mało poznanego źródła zmienności genetycznej, jakim jest zmienność

liczby kopii DNA, mogąca być jedną z przyczyn tzw. problemu brakującej odziedziczalności. Dodatkowo, przeprowadzone analizy zróżnicowania genetycznego poszczególnych populacji na poziomie chromosomowym, pozwoliły na sporządzenie szczegółowego opisu oddziaływania presji selekcyjnej na genomy wybranych ras i dostarczyły informacji na temat szeregu genów kandydujących dla dalszych badań identyfikujących podłoże molekularne zmienności genetycznej cech produkcyjnych. Omawiane badania mają głównie charakter badań podstawowych, jednak są nie bez znaczenia dla identyfikacji potencjalnych markerów selekcyjnych, wykorzystania metod molekularnych w kontroli jakości produktów, bądź zarządzania populacjami zwierząt hodowlanych w oparciu o nowe metody genetyki molekularnej.

## Literatura

- Carothers AD, Rudan I, Kolcic I, Polasek O, Hayward C, Wright AF, Campbell H, Teague P, Hastie ND, Weber JL. 2006. Estimating human inbreeding coefficients: comparison of genealogical and marker heterozygosity approaches. *Ann. Hum. Genet.*, 70:666-676.
- Charlesworth D, Willis JH. 2009. The genetics of inbreeding depression. *Nat. Rev. Genet.*, 10(11):783-96.
- Conrad DF, Pinto D, Redon R i wsp. 2010. Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature*, 464:704-712.
- Dalvit C, De Marchi M, Dal Zotto R, Gervaso M, Meuwissen T, Cassandro M. 2008. Breed assignment test in four Italian beef cattle breeds. *Meat Sci.*, 80:389-395.
- Hayes BJ, Bowman PJ, Chamberlain AJ, Goddard ME. 2009. Invited review: Genomic selection in dairy cattle: progress and challenges. *J. Dairy Sci.*, 92(2):433-443.
- Helyar SJ, Hemmer-Hansen J, Bekkevold D, Taylor MI, Ogden R, Limborg MT, Cariani A, Maes GE, Diopere E, Carvalho GR, Nielsen EE. 2011. Application of SNPs for population genetics of nonmodel organisms: new opportunities and challenges. *Mol. Ecol. Res.*, 11: 123-36.
- Howard JT, Pryce JE, Baes C, Maltecca C. 2017. Invited review: Inbreeding in the genomics era: Inbreeding, inbreeding depression, and management of genomic variability. *J. Dairy Sci.*, 100(8):6009-6024.
- Negrini R, Nicoloso L, Crepaldi P, Milanese E, Colli L, Chegdani F, Pariset L, Dunner S, Leveziel H, Williams JL, Ajmone Marsan P. 2009. Assessing SNP markers for assigning individuals to cattle populations. *Anim. Genet.*, 40:18-26.
- Orozco LD, Cokus SJ, Ghazalpour A, Ingram-Drake L, Wang S, van Nas A, Che N, Araujo JA, Pellegrini M, Lusk AL. 2009. Copy number variation influences gene expression and metabolic traits in mice. *Hum. Mol. Genet.*, 18:4118-4129.
- Paetkau D, Calvert W, Stirling I, Strobeck C. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Mol. Ecol.*, 4:347-354.
- Porto-Neto LR, Lee SH, Lee HK, Gondro C. 2013. Detection of signatures of selection using *F<sub>st</sub>*. *Methods Mol. Biol.*, 1019:423-36.
- Purfield DC, Berry DP, McParland S, Bradley DG. 2012. Runs of homozygosity and population history in cattle. *BMC Genet.*, 13:70.

- Qanbari S, Pimentel EC, Tetens J, Thaller G, Lichtner P, Sharifi AR, Simianer H. 2010. A genome-wide scan for signatures of recent selection in Holstein cattle. *Anim. Genet.*, 41, 377-389.
- Rannala B, Mountain JL. 1997. Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 9197-9221.
- Sabeti PC, Reich DE, Higgins JM, Levine HZ, Richter DJ, Schaffner SF, i wsp. 2002. Detecting recent positive selection in the human genome from haplotype structure. *Nature*, 419, 832-837.
- VanRaden P. 1992. Accounting for inbreeding and crossbreeding in genetic evaluation for large populations. *J Dairy Sci.*, 75:3136-3144.
- VanRaden PM. 2008. Efficient methods to compute genomic predictions. *J Dairy Sci.*, 91:4414-4423.
- Wang K, Li M, Hadley D, Liu R, Glessner J, Grant S, Hakonarson H, Bucan M. 2007. PennCNV: an integrated hidden Markov model designed for high-resolution copy number variation detection in whole-genome SNP genotyping data. *Genome Res.*, 17:1665-1674.

## 5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

Studia na wydziale Zootechnicznym Akademii Rolniczej w Krakowie ukończyłem w 2004 roku, po obronie pracy magisterskiej pt.: „Zmiany ekspresji mRNA kodującego dla proenkefaliny w jajniku owiec podczas cyklu płciowego”, której opiekunem była Pani Prof. dr hab. Krystyna Pierzchała-Koziec, uzyskując stopień magistra inżyniera zootechniki w zakresie hodowli zwierząt. Po podjęciu w roku 2005 pracy w Instytucie Zootechniki Państwowym Instytucie Badawczym moje zainteresowania naukowo-badawcze skupiły się na kilku kierunkach, obejmujących szereg zagadnień związanych z szeroko pojętym wykorzystaniem narzędzi genetyki molekularnej w badaniach prowadzonych u zwierząt gospodarskich i towarzyszących. Do głównych kierunków badawczych, wokół których skupiały się moje zainteresowania można zaliczyć:

- a) doskonalenie i wdrażanie metod genetyki molekularnej w kontroli rodowodów bydła
- b) monitoring populacji pod kątem częstości występowania wybranych wad genetycznych i polimorfizmów związanych z podatnością na choroby
- c) wykorzystanie narzędzi genomiki w badaniach nad zmiennością genomu i zróżnicowaniem genetycznym ras zwierząt gospodarskich (nie będące przedmiotem prezentowanego, głównego osiągnięcia naukowego)
- d) badania z zakresu transkryptomiki i epigenetyki
- e) identyfikacja aberracji strukturalnych i ocena ich związku z występowaniem nowotworów u zwierząt
- f) inne badania wykorzystujące metody genetyki i genomiki

Opis wybranych badań w tym zakresie przedstawiono poniżej:

**ad a) Doskonalenie i wdrażanie metod genetyki molekularnej w kontroli rodowodów bydła**

Wraz z podjęciem pracy w Instytucie Zootechniki PIB, podjąłem się realizacji zadań związanych z opracowaniem procedur otrzymywania surowic odpornościowych dla antygenów grup krwi wykorzystywanych w kontroli rodowodów bydła. W związku z rozwojem metod genetyki molekularnej, uczestniczyłem w pracach zamierzających do wdrożenia do rutynowej weryfikacji rodowodów metod molekularnych, w tym analizy markerów mikrosatelitaranych. Obecnie uczestniczę w procesie testowania i wdrażania markerów SNP do rutynowej kontroli rodowodów bydła. Prace w tym zakresie przyczyniły się zarówno do usprawniania kontroli rodowodów bydła, jak również stały się przedmiotem prac badawczych (D7, D8, D11, E17, E24, E32) oraz zbiorowej nagrody Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi pt.: „Opracowanie uzupełniającego zestawu markerów STR oraz SNP w kontroli rodowodów bydła” (2016).

**ad b) Monitoring populacji pod kątem częstości występowania wybranych wad genetycznych i polimorfizmów związanych z podatnością na choroby.**

Wraz z rozpoczęciem prac nad tematyką badawczą będącą później przedmiotem mojej pracy doktorskiej, moje zainteresowania skoncentrowały się na związku wariantów genetycznych z występowaniem chorób oraz identyfikacji nosicieli niepożądanych mutacji w populacjach zwierząt gospodarskich. Przedmiotem najszerzej zakrojonych badań w tym zakresie stała się podatność bydła na gąbczastą encefalopatię (BSE). Określenie związku polimorfizmu genu prionowego (*PRNP*) oraz jego paralogu (*SPRN*) z podatnością bydła na klasyczną i atypową postać BSE stało się przedmiotem grantu promotorskiego (NN311 013737) oraz mojej pracy doktorskiej (pt.: „Analiza polimorfizmu wybranych genów pod kątem odporności/podatności bydła na encefalopatię gąbczastą” przygotowanej pod kierownictwem Pani Prof. dr hab. Ewy Słoty) i zaowocowało szeregiem publikacji (A2, A3, A11, B1). Badania te poszerzono o analizę wspomnianych genów u owiec ze zdiagnozowaną atypową postacią scrapie (A1).

Prowadzone przez nasz zespół badania odnośnie nosicielstwa niepożądanych mutacji dotyczyły przede wszystkim identyfikacji nosicieli nieprawidłowego wariantu czynnika XI krzepnięcia krwi, powiązanego z zaburzeniami koagulacji oraz płodności i zdrowotności wymienia u krów. W ramach wspomnianych badań, zidentyfikowano nosicieli tej mutacji w polskiej populacji krów rasy holsztyńskiej a otrzymane wyniki stały się przedmiotem oryginalnej pracy naukowej (B2).

**ad c) Wykorzystanie narzędzi genomiki w badaniach nad zmiennością genomu i zróżnicowaniem genetycznym ras zwierząt gospodarskich (nie będące przedmiotem prezentowanego, głównego osiągnięcia naukowego).**

Zagadania z dziedziny genetyki populacyjnej poruszano także w ramach innych prac nie będących przedmiotem głównego osiągnięcia naukowego. We wczesnych badaniach z tego zakresu oceniono polimorfizm i informatywność standardowego genomowego panelu markerów SNP dostępnego na komercyjnych mikromacierzach genotypowych firmy Illumina u bydła zachowawczej rasy polskiej czerwonej. Stwierdzono, że 37 797 spośród 53 438 autosomalnych markerów zawartych na macierzy dostarcza wysokiej jakości informacji



genomowej i może być stosowane do różnych badań z zakresu genomiki dotyczących tej rasy (A5).

W ramach opracowywania alternatywnej dla mikromacierzy metody analizy polimorfizmu w skali genomu u zwierząt gospodarskich, przeprowadzono adaptację metody genotypowania przez sekwencjonowanie do analiz u takich gatunków jak bydło, owce i konie. Opracowana metoda pozwoliła na uzyskanie panelu markerów wykazującego pożądane parametry polimorfizmu i równomiernie rozproszonego w całym genomie, w tym w regionach kodujących geny. W ramach badań wykazano, że zidentyfikowane SNP można z powodzeniem zastosować w genetyce populacyjnej, do analiz zróżnicowania genetycznego badanych ras (A40).

#### **ad d) Badania z zakresu transkryptomiki i epigenetyki**

Dostępność nowoczesnych, wysokowydajnych technik analiz DNA i RNA, pozwoliła mi na podjęcie szeregu zagadnień badawczych związanych z transkryptomiką i epigenomiką zwierząt gospodarskich.

W ramach badań koordynowanych przez Zakład Genetyki Uniwersytetu Rzeszowskiego, podjęto się prac związanych z analizą zmian w poziomie metylacji cytozyn w DNA (jako jednego z głównych mechanizmów epigenetycznych) w wyniku procesu starzenia u koni. W badaniach tych stwierdzono spadek globalnego poziomu metylacji DNA w limfocytach krwi wraz z wiekiem koni. Dodatkowo, określono wzorzec metylacji DNA rybosomalnego i wybranych genów, takich jak *IGF2*, jednak nie stwierdzono istotnych zmian w poziomie ich metylacji podczas procesu rozwoju i starzenia. Zbadano też czy komponenty genetyczne, takie jak polimorfizmy w genach metylotransferaz DNA (DNMT1, DNMT3a i DNMT3b) mogą przyczynić się do obserwowanych zmian w globalnym poziomie metylacji. Analiza siedmiu wewnątrzgenowych polimorfizmów nie wykazała istotnego związku ze zmianami w globalnej metylacji DNA (A7). Badania dotyczące metylacji specyficznych *loci* w genomie konia były kontynuowane i pozwoliły na określenie struktury epigenetycznej i roli polimorfizmów w kształtowaniu wzorców metylacji DNA w locus *OAS1*, związanego z podatnością na infekcję wirusem Zachodniego Nilu u koni (A16).

Kolejne badania prowadzone u koni pozwoliły na przeprowadzanie cało-genomowej analizy porównawczej profilu metylacji pomiędzy zdrową i nowotworowo zmienioną skórą. Badania te wykazały istnienie co najmniej 136 regionów genomu o aberrantnej metylacji w tkance guza sarkoidu, obejmujących szereg genów o znaczeniu onkogennym (A39). Ważnym epizodem w mojej karierze był także udział w badaniach dotyczących zmian w genomowym profilu metylacji w szpiku kostnym u dzieci z B-komórkową ostrą białaczką limfoblastyczną, realizowanych pod przewodnictwem Pracowników Wydziału Medycyny Uniwersytetu Rzeszowskiego. Wykazano w nich, że profil metylacji zmienia się wyraźnie wraz z rozwojem choroby i wykazuje także pewne różnice pomiędzy pacjentami z podstawowymi aberracjami chromosomowymi towarzyszącymi chorobie (A36).

Kolejnym interesującym (obok metylacji DNA) mechanizmem epigenetycznym o potencjalnie dużym znaczeniu dla zdrowotności i cech produkcyjnych zwierząt jest regulacja ekspresji genów za pomocą cząstek micro RNA. Wraz z zespołem badawczym IZ-PIB przeprowadzono szereg badań w tym zakresie, wykorzystując najnowsze techniki genetyki

molekularnej. Wczesne wyniki dotyczyły charakterystyki profilu miRNA w wątrobie świń z wykorzystaniem techniki sekwencjonowania następnej generacji. W badaniach tych wykryto w tkankach wątroby obecność 206 różnych miRNA, z których 68 reprezentowało potencjalne nowe, nieznane cząsteczki miRNA. Pośród nowych cząstek miRNA, zaobserwowano miRNA pochodzące z przeciwnego ramienia spinki prekursora znanych już miRNA oraz warianty długości i sekwencji 3' i 5', prawdopodobnie stanowiące tak zwane izomiry. Na podstawie analizy poziomów ekspresji, odzwierciedlonych przez liczbę odczytów sekwencyjnych, zidentyfikowano najczęstsze, występujące w wątrobie świń typy miRNA (A17).

Inne badania dotyczące miRNA skupiały się na identyfikacji cząstek ulegających aberrantnej ekspresji w tkance sarkoidu końskiego. Różnicowa analiza ekspresji ujawniła istnienie blisko stu miRNA, o zmienionej ekspresji w sarkoidach w porównaniu do zdrowej tkanki, z których wiele opisano we wcześniejszych badaniach jako kluczowe dla procesu transformacji nowotworowej. Wśród miRNA o podwyższonej ekspresji zaobserwowano cząstki związane ze zmniejszeniem zdolności adhezyjnych komórek, a także zaangażowane w globalną produkcję białek, podczas gdy obniżenie poziomu ekspresji zaobserwowano między innymi dla miRNA powiązanych z procesami zwiększającymi możliwości ekspansji komórek. Ponadto zidentyfikowano szereg wariantów miRNA (tzw. izomirów) pomiędzy badanymi tkankami. Dalsza analiza wykazała, że izomiry końca 5' zawierają różne sekwencje rdzeniowe prowadzące do zmiany genu docelowego, a w konsekwencji zmiany aktywności innych ścieżek biologicznych, niż forma podstawowa miRNA (A32).

Znaczącą część realizowanych badań dotyczyła zagadnień związanych z transkryptomiką i różnicami w poziomie globalnej ekspresji genów, powstającymi pod wpływem różnych czynników. Istotna część tych badań prowadzona była w oparciu o techniki sekwencjonowania następnej generacji. We wczesnych badaniach z tego zakresu podjęto się określenia różnic w transkryptomie mięśnia półbłoniastego u dwóch ras świń różniących się tempem wzrostu i jakością mięsa. W badaniach tych zidentyfikowano 35 genów, potencjalnie odpowiedzialnych za obserwowane różnice fenotypowe (A18). Analizie poddano także różnice w transkryptomie pomiędzy mięśniami świń różniącymi się właściwościami histologicznymi. Wyniki wskazały głównie szlaki metaboliczne związane z metabolizmem glukozy i procesami kurczenia się komórek mięśniowych potencjalnie wpływające na strukturę mięśni, procesy metaboliczne w nich zachodzące i pośrednio, cechy jakości mięsa (A29).

Podobne badania przeprowadzono także w odniesieniu do drobiu, porównując transkryptom mięśnia piersiowego u dwóch grup kurcząt rzeźnych różniących się co do ważnego parametru jakości mięsa jakim jest siła cięcia. Analiza ta wskazała 68 genów o potencjalnym znaczeniu dla jakości mięsa broilerów (A22).

Inne badania prowadzone z wykorzystaniem mikromacierzy ekspresyjnych pozwoliły na określenie zmian zachodzących w transkryptomie w wyniku progresji sarkoidów u koni. W badaniach tych łącznie zidentyfikowano 901 genów ulegających różnicowej ekspresji pomiędzy zdrowymi i nowotworowo-zmienionymi próbkami skóry. Znaczący podzbiór genów o obniżonej ekspresji, był związany z supresją transformacji nowotworowej, podczas gdy kilka genów o podwyższonej ekspresji powiązano z procesami wzrostu nowotworu lub aktywnością układu odpornościowego (A30).

Kolejne badania z zakresu transkryptomiki dotyczyły zmian zachodzących w profilu ekspresji genów pod wpływem treningu u koni czystej krwi arabskiej jako efekt adaptacji do wzmożonego wysiłku. Badania te pozwoliły na identyfikację szeregu genów i szlaków metabolicznych odpowiedzialnych za utrzymanie homeostazy podczas długotrwałego obciążenia wysiłkiem (A33).

Odrębny nurt badań stanowiły analizy prowadzone na świńskich mezenchymalnych komórkach macierzystych (MSC). W badaniach tych wykazano, że zastosowanie inhibitora deacetylaz histonowych (Trichostatyny A, TSA) jako czynnika wspomagającego reprogramowanie epigenetyczne komórek dla celów klonowania, powoduje istotne zmiany w transkryptomie tych komórek, polegające głównie na stymulacji ekspresji genów powiązanych ze szlakami różnicowania, rozwoju, neurogenyzy i miogenezy (A35). Kontynuacja omawianych badań pozwoliła na określenie zmian w transkrytomie MSC w wyniku kriokonserwacji i późniejszego traktowania TSA. W badaniach tych zaobserwowano wyraźne zmiany w poziomie ekspresji tysięcy genów jako wynik kriokonserwacji, sugerujących zaangażowanie w reakcję na stres termiczny i uszkodzenia mechaniczne z nią związane, szeregu genów odpowiedzialnych za procesy zaangażowane w regulację napięcia błon komórkowych, naprawę uszkodzeń błony, utrzymanie kształtu komórek, homeostazę energetyczną i mediację apoptozy. Stwierdzono także, że TSA jest w stanie przeciwdziałać do pewnego stopnia zaobserwowanym zmianom transkryptomu, jednak jego specyfika i zalety dla odzyskiwania komórek po kriokonserwacji wymagają dalszych badań (A42).

#### **ad e) Identyfikacja aberracji strukturalnych i ocena ich związku z występowaniem nowotworów u zwierząt**

Wraz z opracowaniem metod pozwalających na identyfikację aberracji strukturalnych genomu w postaci aberracji liczby kopii z wykorzystaniem informacji pozyskanych z mikroamcierzami geotypujących, podjąłem tematykę badawczą odnośnie roli i znaczenia tego typu wariantów w progresji nowotworów u zwierząt. Przedmiotem badań prowadzonych we współpracy z Zakładem Genetyki Ogólnej i Molekularnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie stały się m. in. psy, jako gatunek u którego nowotwory są częstym problemem zdrowotnym. Uzyskane wyniki pokazały, że aberracje strukturalne są powszechnym zjawiskiem towarzyszącym rozwojowi nowotworu i są bardziej złożone i częstsze w nowotworach pochodzenia mezenchymalnego niż w nowotworach pochodzenia nabłonkowego. Aberracje zaobserwowane w DNA nowotworu, w porównaniu do zdrowych tkanek, charakteryzowały się większymi rozmiarami, większą liczbą amplifikacji, a w niektórych przypadkach obejmowały geny o znanym wpływie na progresję nowotworu (A10).

Uczestniczyłem także w badaniach o zbliżonym charakterze, dotyczących znaczenia aberracji liczby kopii w progresji sarkidów u koni. Badania te wykazały zwiększoną niestabilność genomu komórek sarkoidowych, przejawiającą się dużą częstością występowania aberracji liczby kopii i utratą heterozygotyczności, często w obrębie genów supresorowych i onkogenów istotnych dla progresji różnych typów nowotworów (A34).

#### **ad f) Inne badania wykorzystujące metody genetyki i genomiki**

W toku mojej działalności naukowej podejmowałem się także szeregu innych zagadnień badawczych, zarówno w ramach zespołu IZ-PIB, jak i współpracy z innymi ośrodkami badawczymi. Badania te dotyczyły m. in. opracowania metody identyfikacji płci w próbach pozyskanych od jelenia szlachetnego w oparciu o polimorfizm genu amelogeniny (*AMELX* i *AMELY*) (B3). Inne badania, w których brałem udział, były koordynowane przez Pracowników Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie i skupiały się na analizie polimorfizmu genu miostatyny (powiązanego ze zdolnościami wyścigowymi koni) u pięciu różnych ras kani. Pozwoliły one na wykrycie nowego, wcześniej nieopisanego haplotypu genu *MSTN* występującego u badanych koni zimnokrwistych (A14).

W ramach badań dotyczących przemysłowych szczepów drożdży koordynowanych przez Pracowników Zakładu Genetyki Uniwersytetu Rzeszowskiego, moja rola polegała na określeniu zmian zachodzących w ich genomie pod wpływem szeregu pasaży, jak również oddziaływania etanolu. Większość z wykrytych wariantów DNA, które uległy zmianom po 100 pasażach, koncentrowała się w określonych lokalizacjach chromosomowych (klastry) na chromosomach V, X, XI, XIII i XIV i reprezentowała potencjalne regiony o wyższej podatności na powstawanie mutacji, regiony genomowe kodujące funkcjonalnie ważne geny lub regiony genomu o niskiej złożoności sekwencji (A20).

Celem innej pracy realizowanej pod przewodnictwem Zakładu Genetyki Ogólnej i Molekularnej, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie była identyfikacja polimorfizmów i mutacji w mitochondrialnym genie *ND4* oraz analiza powiązań pomiędzy występowaniem zmian molekularnych w mtDNA a cechami fenotypowymi w nowotworach u owczarków niemieckich. Badania te wskazały na istotny związek między występowaniem mutacji w trzech *loci* genu *ND4* a lokalizacją nowotworów (A28).

Moje zainteresowania związane z analizą bioinformatyczną okazały się przydatne w ramach badań koordynowanych przez Aquaculture Research Group, Moredun Research Institute (Penicuik, UK) nad genomami szczepów paciorkowców z grupy B (*Streptococcus agalactiae*), wyizolowanych z mózgow klinicznie chorych ryb z gatunku tilapia (*Oreochromis niloticus*). Zaowocowały one publikacją sekwencji genomów dwóch różnych serotypów w międzynarodowej bazie danych NCBI (NKQA00000000, NKPZ00000000, NKPY00000000, NKQD00000000, NKQC00000000, NKQB00000000) oraz publikacją danych na temat tych genomów (A41, A45).

## 6. SUMARYCZNE ZESTAWIENIE DOROBKU NAUKOWEGO

Mój dorobek obejmuje łącznie 153 pozycje, spośród których 51 to prace opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych. Czterdzieści siedem prac ukazało się w czasopismach wykazanych w bazie JCR a pięć z nich stanowi główne osiągnięcie naukowe. **Łączna wartość punktowa** (wg listy MNiSW) wszystkich moich publikacji wynosi **1160 pkt.**, przy czym prace wchodzące w skład głównego osiągnięcia mają wartość punktową równą 120. **Sumaryczny Impact Factor** opublikowanych prac wynosi **83,465**. Łączna liczba cytowań opublikowanych prac wg bazy Web of Science to 127 (103 bez autocytowań), a indeks Hirsch'a 6.

## Zestawienie dorobku naukowego

Publikacja	Przed doktoratem			Po doktoracie			Łącznie		
	Liczba	IF	KBN	Liczba	IF	KBN	Liczba	IF	KBN
Publikacje stanowiące główne osiągnięcie naukowe	-	-	-	5	7,88	120	5	7,88	120
Inne prace naukowe opublikowane w czasopismach wykazanych w bazie JCR	3	3,48	40	39	72,11	975	42	75,59	1015
Inne prace naukowe opublikowane w czasopismach niewykazanych w bazie JCR	-	-	-	4	-	25	4	-	25
Publikacje w materiałach z konferencji międzynarodowych	1	-	-	68	-	-	69	-	-
Publikacje w materiałach z konferencji krajowych	3	-	-	30	-	-	33	-	-
<b>Razem</b>	<b>7</b>	<b>3,48</b>	<b>40</b>	<b>146</b>	<b>79,99</b>	<b>1120</b>	<b>153</b>	<b>83,47</b>	<b>1160</b>

Artur Gurgul