

Dr hab. prof. IGHZ Mariusz Pierzchała
Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt
Polskiej Akademii Nauk
ul. Postępu 36A 05-552 Jastrzębiec

Recenzja pracy doktorskiej mgr Ilony Mitki

pt. " Rola wybranych genów szlaku biosyntezy triacylogliceroli w kształtowaniu parametrów jakościowych i sensorycznych mięsa wieprzowego" wykonanej w Instytucie Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy pod kierunkiem dr hab. Mirosława Tyry, prof. IZ i dr hab. Katarzyny Ropki-Molik jako promotora pomocniczego

W Polsce wieprzowina jest wciąż preferowanym rodzajem spożywanego mięsa, w porównaniu z mięsem drobiowym i wołowiną. Ilość konsumowanej wieprzowiny wynosi ok. 40 kg rocznie na mieszkańca, co stanowi około 60-70 % ogólnego spożycia mięsa wg GUS.

Tradycje kulturowe oraz preferencje kulinarne, stanowią że wieprzowina zapewne przez długie lata pozostanie bardzo ważnym składnikiem naszej diety. Od lat panuje powszechne przekonanie o niekorzystnym wpływie mięsa wieprzowego na zdrowie człowieka. Wciąż rozpowszechnione są opinie, że jego udział w diecie powinien być ograniczony, bowiem przyczynia się m.in. do zwiększenia występowania chorób układu krążenia, ze względu na wzrost poziomu tzw. „złego cholesterolu” (frakcja LDL).

Systematyczna praca hodowlana spowodowała zwiększenie zawartości mięsa w tuszy i znaczące obniżenie jej otluszczenia. Dlatego też obecnie argument, dotyczący nadmiernej zawartości tłuszczu w mięsie wieprzowym jest już właściwie przestarzały. Zwraca się jednak też uwagę na poprawę jakości mięsa wieprzowego. Ukierunkowana selekcja z wykorzystaniem narzędzi molekularnych pozwala w zdecydowanym stopniu wyeliminować z populacji trzody chlewnej niepożądane warianty genów obniżających jakość mięsa. Typowym przykładem jest eliminacja wariantu genu decydującego o zwiększonej podatności na stres (*RYRI*). Intensywna selekcja w znacznym stopniu zmniejszyła częstość występowania mięsa wadliwego typu PSE. Cechy jakości mięsa są nisko odziedziczalne co stanowi trudność w dokładnym charakteryzowaniu genetycznego podłoża i wytypowaniu markerów genetycznych użytecznych w selekcji. Doskonalenie świń czystorasowych w Polsce, uwzględnia parametry jakości mięsa, decydujące o wartości wieprzowiny w procesach

przetwórczych i walorach kulinarnych, takich jak: kwasowość, wodochłonność, barwa i przewodność elektryczną oraz zawartość tłuszczu śródmięśniowego.

Spośród wymienionych cech jakości mięsa zawartość tłuszczu śródmięśniowego jest jedną z tych cech, która decyduje w dużej mierze o walorach smakowych mięsa wieprzowego oraz jego przydatności technologicznej. Na wartość tej cechy i oprócz genetycznego podłoża istotny wpływ mają czynniki środowiskowe w tym żywienie. Skład diety wpływa na poziom IMF. Istotną rolę odgrywa tu metabolizm kwasów tłuszczowych, który też jest też ściśle związany z syntezą triacylogliceroli. Kwasy tłuszczowe oprócz funkcji strukturalnych odgrywają w komórce także bardzo ważną rolę w regulacji proliferacji i różnicowania komórek, aktywacji enzymów regulujących biosyntezę białek. Nadmiar lub niedobór kwasów nienasyconych n-3 i n-6, a szczególnie ich nieodpowiedni stosunek w diecie może wpływać na nieprawidłowe funkcjonowanie całego organizmu. Obserwowany korzystny efekt WNKT, a szczególnie kwasów n-3, jest prawdopodobnie spowodowany ich bezpośrednim wpływem na aktywność jądrowych czynników transkrypcyjnych, a w konsekwencji zmianami w ekspresji wielu genów. Oddziaływanie WNKT na organizmie odbywa się w dużym stopniu za pośrednictwem ich pochodnych - eikozanoidów. Eikozanoidy wpływają na regulację czynności układu sercowo-naczyniowego, ciśnienie krwi, procesy zapalne oraz stężenie triacylogliceroli w osoczu. Wielonienasycone kwasy tłuszczowe (WNKT) podobnie jak inne bioaktywne składniki diety mogą w znacznym stopniu wpływać na funkcjonowanie i zdrowie organizmu. Zwłaszcza kwasy omega-3 wykazują pozytywne działanie w redukowaniu stężenia triacylogliceroli w osoczu krwi poprzez hamowanie ich resyntezy w ścianie jelit i wątrobie nawet o 30 %.

Coraz częściej podejmowane badania nutrigenetyczne i nutrigenomiczne charakteryzujące interakcje żywienia i genotypu, wymagają kompleksowej wiedzy dotyczącej polimorfizmu wybranych kluczowych genów uczestniczących w przemianach metabolicznych.

Pani **mgr Ilona Mitka** w prezentowanej rozprawie podjęła się szczegółowej analizy związku genów kodujących enzymy acylotransferazy glicerolo-3-fosforanu *GAPT* 1 i 2 zaangażowanych w szlak biosyntezy triacylogliceroli z cechami jakości mięsa wieprzowego.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest monografią, w skład której wchodzi 5 rozdziałów : Wstęp, Cel Pracy, Materiał i Metody, Wyniki, Dyskusja, Stwierdzenia i wnioski.

Praca liczy 164 strony tekstu, 167 pozycji literaturowych, 17 stron wprowadzenia obejmującego przegląd literaturowy, 1 stronicowy szczegółowo opisany cel pracy, 19 stron

opisu materiału i zastosowanych metod badawczych, 57 stron opisu uzyskanych wyników, 11 stron dyskusji oraz 2 strony wniosków, 2 stronicowe Streszczenia w języku polskim i angielskim. Ponadto do pracy dołączone są dodatkowe informacje uzupełniające w postaci obszernego suplementu (27 stron) zawierającego ryciny przedstawiające wyniki analiz identyfikacji polimorfizmu wymienionych genów.

Przedstawiona praca jest zgodna z wymogami stawianymi rozprawie doktorskiej, zawiera właściwie sprecyzowane cele badawcze. Prezentowane badania, metody i uzyskane wyniki zostały omówione wnikliwie, uwzględniając najnowsze dane literaturowe obejmujące dany obszar wiedzy.

Ocena Merytoryczna

1. *Oryginalność tematyki i wartość poznawcza pracy*

Prezentowana praca podejmuje nowy temat do tej pory nie będący dokładnie przebadany. Uzasadnienie i omówienie podjętego zagadnienia zostało przedstawione w sposób wnikliwy i przekonujący o konieczności i celowości podjętych badań.

We wstępie autorka szczegółowo opisała zagadnienia dotyczące cech jakości mięsa o istotnym znaczeniu dla wartości technologicznej jak i kulinarnej oraz ich charakterystykę jak i stosowane metody pomiarowe. Opisując aktualny stan wiedzy przedstawiła informacje dotyczące badań z wykorzystaniem narzędzi molekularnych w tym liczby zmapowanych loci cech ilościowych u świń (QTL). Wyróżniła też najważniejsze geny uznawane za istotne dla jakości mięsa wieprzowego, które są skutecznie wykorzystywane w selekcji. Można byłoby wymienić znacznie większą liczbę genów, co do których są udokumentowane w literaturze dane o ich związku z cechami jakości mięsa i tuszy świń takie jak m.in. czynniki wzrostu (*GH*, *IGF*), czynniki miogenne (*MyoD*), białka wiążące kwasy tłuszczowe (*FABP*). Poszukiwania genów o istotnym wpływie na cechy użytkowe świń w tym jakość mięsa wieprzowego była i jest prowadzona, weryfikując polimorfizm i ekspresję wybranych genów.

W tym nurcie badań autorka scharakteryzowała geny kodujące acyltransferazy glicerolo-3-fosforanu (*GPAT1*, *GPAT2*), które są związane z biosyntezą triacylogliceroli jako kandydujące do genów wpływających na jakość mięsa.

Przedstawiony przegląd piśmiennictwa w pełni uzasadnia podjęcie tematu badań, nie wystarczająco dokładnie opisanego w literaturze naukowej.

Zdefiniowanie celów/ hipotez badawczych

Doktorantka w sposób klarowny zdefiniowała cele i opisała metody badawcze, które obejmują kompleksowe analizy polimorfizmu i ekspresji wybranych genów oraz zależności pomiędzy wybranymi polimorfizmami genów *GPAT1* i *GPAT2*, ich ekspresją, a parametrami

jakościowymi i sensorycznymi mięsa wieprzowego ze szczególnym uwzględnieniem zawartości tłuszczu śródmięśniowego w mięśniu najdłuższym grzbietu.

Zakres i metody badań

Materiałem do badań w prezentowanej pracy były loszki ras: polskiej białej zwislouchej, wielkiej białej polskiej, puławskiej, pietrain i duroc, będące potomstwem kojarzeń knurów i loch hodowanych w stadach zarodowych, których tusze zostały poddane szczegółowej dysekcji oraz ocenie parametrów umięśnienia, otluszczenia, jak i podstawowych cech jakości mięsa.

Przeprowadzone analizy molekularne genu GPAT1 objęły analizę polimorfizmu 24 fragmentów obejmujących 21 egzonów, 19 intronów i oraz region regulatorowy 3'UTR. Analiza objęła próbki DNA pochodzące od trzech ras świń (puławska, pietrain, wbp), po 16 losowo wybranych osobników z każdej rasy.

Podobnie w odniesieniu do genu GPAT2 Autorka przeprowadziła poszukiwania polimorfizmów w całym genie dzieląc go na 14 fragmentów, analizy wykonała na 72 osobnikach, po 24 sztuki losowo wybrane z ras pbz, puławskiej i duroc.

W poszukiwaniach polimorfizmu DNA wykorzystwała technikę PCR połączoną z analizą krzywych topnienia denaturowanego amplikonu DNA (PCR-HRM). Weryfikacja i ocena polimorfizmu została przeprowadzona za pomocą sekwencjonowania DNA metodą Sanger'a a następnie metodą PCR-RFLP z zastosowaniem odpowiednich endonukleaz .

Stosując powyższe metody Autorka oszacowała frekwencję zidentyfikowanych alleli *GPAT1* i 2 na obszernym materiale doświadczalnym obejmującym 944 osobniki pochodzące z pięciu ras (pbz – 352, wbp – 301, puławska – 152, pietrain – 83, duroc – 56),

W kolejnym etapie przeprowadziła analizę ekspresji wybranych genów stosując metodę Real-time PCR. W analizach ekspresji materiał biologiczny użyty do badań stanowiły próbki mięśnia najdłuższego grzbietu (*m. longissimus lumborum*), tkanki tłuszczowej (słoniny) oraz wątroby pobrane poubojowo, łącznie przeanalizowała 47 loszek należących do pięciu ras.

Następnie Doktorantka przeprowadziła analizy statystyczne z zastosowaniem równań liniowego modelu regresji przy wykorzystaniu pakietu statystycznego SAS (SAS Institute, Cary, NC, v.8.02,2001). Oszacowała efekty addytywne i dominujące wymienionych loci na cechy użytkowe i mięsne świń oraz stopień korelacji ekspresji genów z cechami użytkowymi świń.

Wyniki zrealizowanych badań

Na podkreślenie zasługuję szeroki zakres przeprowadzonych przez doktorantkę badań w szczególności analiz molekularnych.

Przy zastosowaniu metody PCR HRM autorka przeprowadziła analizy we wszystkich sekwencjach kodujących genu *GPAT1*, i *GPAT2* tj. w tym w regionach regulatorowych 5' i 3'UTR. W analizowanych fragmentach genu *GPAT1* wykazała obecność 38 mutacji typu SNP. Dwanaście zidentyfikowała w regionach kodujących, trzynaście w intronach oraz czternaście mutacji w regionie 3'UTR. Zidentyfikowała również czternasto - nukleotydowy polimorfizm typu In/del położony w intronie 2 genu. Jedną spośród zidentyfikowanych w regionach kodujących *GPAT1* mutacji zmieniała sekwencję aminokwasów w białku z alaniny na walinę, była zlokalizowana była w egzonie 2. W genie *GAPT1* w egzonie 2 autorka zidentyfikowała mutację punktową powodującą zmiany w procesie składania genu z prekursorowego mRNA.

W analizowanych fragmentach genu *GPAT2* zidentyfikowała znacznie mniej tylko trzy mutacje z czego jedna była położona w regionie 5' UTR a dwie pozostałe w intronach genu.

Do szerszych analiz Autorka wybrała 4 mutacje, dla których oszacowała frekwencję alleli i genotypów oraz równowagę Hardy'ego-Weinberg'a, dla pięciu ras świń. W przeprowadzonych analizach autorka wskazała na istotną różnicę pomiędzy frekwencją genotypów obserwowaną i oczekiwaną, badane populacje pbz i duroc w omawianych *loci* znajdowały się w stanie nierównowagi Hardy'ego Weinberga. Fakt ten autorka przypisuje presji selekcyjnej, jakiej poddawane materiał hodowlany objęty badaniem.

Doktorantka przeprowadziła bardzo szczegółową analizę cech rzeźnych, cechy jakości i tekstury mięsa dla poszczególnych ras świń, wskazując na istotnie wyższą mięsność rasy pietrain. Z prezentowanych tabel wynika, że zawartości tłuszczu śródmięśniowego (IMF) w mięśni najdłuższym grzbietu zwierząt był stosunkowo niski u 4 z 5 analizowanych ras, bo wynosił zaledwie 1,39%, jedynie u rasy duroc był na poziomie 2,37%.

Autorka podkreśla też fakt, że zawartość tłuszczu śródmięśniowego charakteryzowała się wysokim wskaźnikiem zmienności, co wskazuje na możliwość prowadzenia selekcji osobników o korzystnym poziomie IMF w obrębie analizowanych ras.

Kompleksowe analizy parametrów tekstury mięsa analizowane w mięśni polędwicy (*longissimus lumborum*) wykazały najkorzystniejsze wartości u rasy puławskiej.

Natomiast w odniesieniu do cech tucznych, rasa puławska oraz pietrain uzyskiwały gorsze parametry niż pozostałe rasy.

Analizy polimorfizmów genów GPAT1 i 2

Doktorantka w przeprowadzonych analizach statystycznych wykazała istotny związek pomiędzy analizowanymi polimorfizmami, a wybranymi cechami jakości i tekstury mięsa oraz cechami dotyczącymi otluszczenia i umięśnienia tuszy.

Autorka wykazała, że polimorfizm *GPAT1_1* różnicował uwzględnione w badaniach rasy świń pod względem wydajności rzeźnej, masy polędwicy i masy polędwicy. Zwierzęta rasy puławskiej i duroc posiadające w swoim genotypie allel C charakteryzowały się lepszymi wskaźnikami wydajności rzeźnej i masy polędwicy w porównaniu do pozostałych osobników. W przypadku polimorfizmu *GPAT1_2* allel T miał korzystny wpływ na masę polędwicy, wydajność rzeźną. Wskazała jednak też rasowe zróżnicowanie. Dla polimorfizmu *GPAT1_3*, doktorantka wskazała rasowo specyficzne zależności, które dotyczyły głównie wskaźników związanych z masą polędwicy.

W przeprowadzonych analizach dotyczących wskaźników fizyko-chemicznych stwierdzona została statystycznie istotna zależność między *GPAT1_1* (g.133513422C>T) a zawartością IMF w *m. longissimus lumborum*, odczynem pH mięśnia półbłoniastego szynki oraz twardością mięsa polędwicy, wskazująca jako korzystniejsze genotypy CC i CT.

Dla genu *GPAT2* (g.48497102G>A), istotna zależność dotyczyła, zawartości IMF, oraz wskaźników twardości mięsa *m. longissimus lumborum*, wskazując allel G jako korzystny względem wymienionych cech.

Analiza funkcjonalna genów GPAT1 i GPAT2

Doktorantka przeprowadziła analizę ekspresji genów *GPAT1* i *GPAT2*. Uzyskane wyniki dla genu *GPAT1* potwierdziły istotne statystycznie zróżnicowanie pomiędzy badanymi tkankami oraz rasami. Najwyższą ekspresję genu *GPAT1* odnotowano w wątrobie i była ona ponad 28 razy wyższa niż w mięśniu polędwicy oraz ok 70 razy wyższa niż w tłuszczu okrywowym. Najwyższy poziom ekspresji genu *GPAT1* w *m. longissimus lumborum* zaobserwowano dla rasy duroc. Natomiast ekspresję genu *GPAT2* odnotowano jedynie w wątrobie, nie wykazano jednak statystycznych różnic pomiędzy rasami.

W odniesieniu do wpływu polimorfizmów *GPAT1_1*, *GPAT1_2*, *GPAT1_3* na poziom ekspresji genu *GPAT1*, przeprowadzona analiza statystyczna wykazała jedynie istotny związek mutacji *GPAT1_1* z poziomem ekspresji tego genu w tłuszczu okrywowym i w wątrobie.

Przeprowadzona analiza korelacji poziomu ekspresji genów *GPAT1* i *GPAT2* z cechami użytkowymi świń dostarczyła też istotnych zależności.

Doktorantka Wykazała istotną zależność między ekspresją *GPAT1* w tłuszczu okrywowym, w mięśni polędwicy i wątrobie a wielkością i masą polędwicy, oraz między ekspresją w wątrobie a procentową zawartością mięsa w tuszy oraz masą wyrębów podstawowych.

W podsumowaniu Doktorantka krytycznie zauważa, że przeprowadzone badania wskazują na brak możliwości bezpośredniego wykorzystania badanych mutacji genów *GPAT1* i *GPAT2* w procesach selekcyjnych, jednakowoż nierówna frekwencja genotypów może wskazywać, że geny te były pod presją selekcyjną. Co jest przesłanką do dalszych badań tych genów związanych poprawą jakości wieprzowiny.

Powyżej przedstawione wybrane wyniki są częścią bardzo szczegółowo analizowanego tematu niniejszej rozprawy. Autorka wykazała się dużą skrupulatnością i pracowitością zarówno wykonując analizy jak i dokładnie je omawiając.

Niemniej jednak w analizie i opisie są pewne elementy które wymagają korekty bądź dodatkowego wyjaśnienia:

1. Nazwy ras w języku polskim piszemy z małej litery.
2. Czy zidentyfikowane przez autorkę mutacje były nowymi czy pokrywały się z mutacjami już zidentyfikowanymi. W *locus* genu *GPAT1* zgłoszonych do tej pory zostało 1355 mutacji a w *locus* genu *GPAT2* 1620 mutacji do bazy Ensembl (genom referencyjny *Sus scrofa* 11.1).
3. Czy autorka podejmowała próbę zestawienia haplotypów analizowanych mutacji i ich wpływu na cechy.
4. Czy był analizowany wpływ mutacji, które zmieniały sekwencje aminokwasów, polimorfizm typu indel, czy polimorfizm powodujący zmianę sposobu składania genów, na ekspresję oraz wymienione cechy użytkowe.
5. Wykres 2 i 3. opisujący poziom ekspresji genu *GPAT1* nie są do końca czytelne ze względu na różną skalę ekspresji, sugerowałbym zastosowanie dodatkowej skali
6. W części dotyczącej stwierdzeń i wniosków mam jedną uwagę, że niektóre z nich są natury ogólnej dotyczącej materiału badawczego (1, 2, 3, 6) i jako takie są już omawiane w dyskusji, nie były też głównym celem pracy, dotyczącym związku pomiędzy kodującymi genami – *GPAT1* i *GPAT2*, a cechami jakości mięsa, parametrami tekstury, jak również cechami tucznymi.

Wymienione uwagi nie umniejszają wartości rozprawy i prezentowanych w niej wyników, Niniejszą pracę oceniam bardzo wysoko, zarówno od strony merytorycznej jak i formy.

Podsumowując recenzję stwierdzam, że niniejsza praca doktorska spełnia wymogi art.13 ust.1 Ustawy z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 56 poz. 595 z 2003 r. z późn. zm.) i wnoszę o dopuszczeniu **mgr Ilony Mitki** do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, ze względu na duży zakres zrealizowanych badań, dokładnie i skrupulatnie przeprowadzoną analizę wnoszę o wyróżnienie niniejszej rozprawy.

Jastrzębiec 29 marca 2018r.

dr. hab. Mariusz Pierzchała prof. IGHZ PAN

