

Olsztyn, 11.07.2017 r.

Prof. dr hab. Urszula Czarnik
Katedra Genetyki Zwierząt
Wydział Bioinżynierii Zwierząt
UWM w Olsztynie

Recenzja pracy doktorskiej mgr Grzegorza Smołucha
pt. **POLIMORFIZM I EKSPRESJA GENÓW KODUJĄCYCH BIAŁKA Z NADRODZINY TGF- β**
W ASPEKTCIE PLENNOŚCI OWIEC

wykonanej pod kierunkiem dr hab. Anny Kozubskiej-Sobocińskiej, prof. IZ PIB
i promotora pomocniczego dr Agaty Piestrzyńskiej-Kajtoch

Rozwój genetyki molekularnej umożliwia obecnie identyfikację pojedynczych genów oraz analizę poziomu ich ekspresji warunkujących syntezę produktów o istotnym znaczeniu biologicznym. W naukach zootechnicznych badania podstawowe z tego zakresu od początku w sposób naturalny zmierzają do wskazania markerów genetycznych przydatnych w doskonaleniu cech użytkowych zwierząt gospodarskich, w tym cech reprodukcyjnych owiec. Badania te stymulowane są względami ekonomicznymi, gdyż zwiększenie plenności owiec jest jednym z najważniejszych celów hodowlanych, bezpośrednio wpływających na jej opłacalność. Niska odziedziczalność cech reprodukcyjnych, wynikająca m.in. z poligenicznego charakteru ich warunkowania a w konsekwencji mała skuteczność selekcji skłaniają do podjęcia badań nad poznaniem molekularnych podstaw zmienności osobniczej, warunkującej plenność owiec. Zaangażowanie kilku ośrodków naukowych zaowocowało wskazaniem jednego genu głównego *BMPR1B* z mutacją oznaczoną jako *FecB*, której obecność jest związana ze zwiększoną plennością, ale nie występującą u rodzimych ras owiec. W świetle powyższych rozważań wybór tematyki badawczej mgr Grzegorza Smołucha uważam za aktualny i uzasadniony.

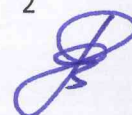
Charakterystyka pracy

Praca doktorska mgr Grzegorza Smołucha stanowi solidną syntezę wiedzy z zakresu polimorfizmu i ekspresji genów kodujących białka z nadrodziny TGF- β ,



potencjalnie mogących mieć wpływ na plenność owiec. Ma ona formę klasycznej rozprawy naukowej i obejmuje rozdziały: Wprowadzenie, Przegląd literatury, Cel pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie i wnioski oraz Bibliografię, tworzące łącznie wraz ze spisem treści, wykazem stosowanych skrótów oraz streszczeniem w języku polskim i angielskim przejrzystą strukturę całości opracowania liczącą 140 stron maszynopisu, W pracy zamieszczono również „Materiały uzupełniające” zawierające 6 aneksów odnoszących się do części metodycznej i wynikowej pracy. Dysertacja została napisana z zachowaniem właściwej sekwencji omawianych zagadnień a poszczególne fragmenty tekstu zawierają informacje podane w sposób uporządkowany i przejrzysty. Na podkreślenie zasługuje staranność przygotowana strony graficznej a zamieszczone ryciny umożliwiają śledzenie omawianych zagadnień. Wykaz cytowanej literatury jest obszerny i obejmuje 185 pozycji, z których tylko 6 to prace polskojęzyczne, których zamieszczenie było niezbędne do charakterystyki ras owiec. 51 % prac została opublikowana w ostatnich 8-10 latach w znanych i cenionych czasopismach o zasięgu międzynarodowym.

Problematykę rozprawy Autor zasygnalizował w krótkim jednostronicowym wprowadzeniu, w którym skupił się na uzasadnieniu wyboru do badań 3 genów kodujących białka z nadrodziny TGF- β , potencjalnie mogących być związanych z plennością owiec. Pełne uzasadnienie podjętych badań na tle bogatej literatury Autor przedstawił w rozdziale Przegląd literatury. W tej części w sposób czytelny i systematyczny omówił dotychczasowe wyniki badań z zakresu procesów fizjologicznych zachodzących podczas cyklu rujowego u owiec oraz podjął próbę wyjaśnienia genetycznego uwarunkowania plenności. Dużo miejsca poświęcił na omówienie transformujących czynników wzrostu TGF- β ze szczególnym uwzględnieniem trzech białek tj.: BMP-15, GDF-9 i AMH. W tej części omówił ich funkcję fizjologiczną oraz budowę i organizację genów je kodujących. Rozdział ten został również wzbogacony dokładną charakterystyką trzech ras owiec uwzględnionych w badaniach (Romanowaska, Wrzosówka, Cakiel podhalański). Wielowątkowa i staranna kompilacja wyników badań krajowych i zagranicznych z tego zakresu świadczy o dobrej orientacji Autora w obszarze badawczym, w którym mieści się przygotowana rozprawa. Właściwy dobór pozycji bibliograficznych pozwoliły Autorowi wytyczyć cztery cele szczegółowe, które odzwierciedlają poszczególne etapy przeprowadzonych badań i analiz. Stały się one podstawą do sformułowania dwóch celów utylitarnych



o charakterze naukowym. Szkoda, że przy tak szerokim spektrum badań Autor nie podjął się trudu sprecyzowania hipotezy badawczej.

W rozdziale Materiał i metody Autor opisał uwzględniony w badaniach materiał zwierzęcy, zastosowane techniki molekularne, przeprowadzone analizy laboratoryjne i bioinformatyczne oraz statystyczne. Godnym uznania jest liczba i opis zastosowanych analiz bioinformatycznych, w którym Autor podaje pełną argumentację wykorzystanych narzędzi. Na uwagę zasługuje również ułatwiające percepcję bardzo dobre graficzne przedstawienie kolejności działań objętych metodyką badań, zmierzających do osiągnięcia przyjętego celu pracy. Podane w tym rozdziale informacje upoważniają mnie do stwierdzenia, że doświadczenie zostało zaprojektowane profesjonalnie, z uwzględnieniem nowoczesnych metod badawczych i analitycznych. Należy również zwrócić uwagę na ogromną czasowo- i pracochłonność zastosowanych metod badawczych.

W tym rozdziale pewien niedosyt budzi jedynie lakoniczny opis materiału zwierzęcego, zwłaszcza wykorzystanego do analizy ekspresji genów *BMP-15*, *GDF-9* i *AMH*, którą przeprowadzono w pięciu grupach wiekowych. Informację na temat wieku owiec Autor zamieścił w Aneksie III, natomiast brak jest wyjaśnienia co było kryterium utworzenia grup wiekowych, jak również dlaczego w tych badaniach dodatkowo włączono owce rasy Merynos Polski. Informacji tych nie znalazłam również w dalszych rozdziałach pracy.

W następnej części opracowania (Wyniki) Autor zamieścił wyniki uzyskane z kolejnych etapów badań zmierzających do wskazania markerów genetycznych cech związanych z plennością owiec. Stosując metodę sekwencjonowania określił sekwencję fragmentów trzech badanych genów, którą porównał z sekwencją referencyjną zdeponowaną w GenBank. Uwzględniając zidentyfikowane polimorfizmy przeprowadził analizę asocjacyjną z wartością badanych cech reprodukcyjnych. Należy uznać, że są to wyniki wiarygodne, gdyż Autor wykluczył obecność mutacji w genie *BMPR1B* (gen główny) oznaczonej jako *FecB*, której obecność jest związana ze zwiększoną plennością. Dopełnieniem tych badań było przeprowadzenie analizy ekspresji genów *BMP-15*, *GDF-9* i *AMH* w tkance jajnikowej. Wykazał, że gen *GDF-9* podlega ekspresji w wielu tkankach, podczas gdy transkrypty genów *BMP-15* i *AMH* były obecne wyłącznie w tkance jajnikowej, co niewątpliwie sugeruje ich rolę w reprodukcji owiec. Dodatkowo stosując technikę Real-Time PCR wykazał, że w tkance jajnikowej poziom ekspresji genów *BMP-15* i *GDF-9* nie zależy od wieku owiec, podczas gdy ekspresja genu *AMH* zmienia się wraz

wiekami. Uważam, że ze względu na kompleksowość przeprowadzonych badań, uwzględniających wszystkie możliwe etapy analizy uzyskane wyniki otwierają nowe horyzonty badawcze i jak wskazuje Autor mogą stanowić przyczynek do dalszych badań.

W mojej ocenie opis wyników jest kompletny i szczegółowy. Wyniki przeprowadzonych badań Autor zamieścił w 37. tabelach i na 7. wykresach oraz na 23 rycinach. Na szczególne podkreślenie zasługuje doskonale opracowana graficzna prezentacja wyników, która bez trudu pozwala czytelnikowi zapoznać się z dużą dawką informacji zamieszczonej w tej części pracy. Konstrukcja oraz objaśnienie zestawień tabelarycznych i wykresów są informatywne i nie wymagają korekty redakcyjnej.

Dyskusja wyników bezpośrednio nawiązuje do zakresu przeprowadzonych badań i odpowiada podrozdziałom zamieszczonym w części wynikowej pracy. Została napisana z dużą znajomością zagadnienia i literatury źródłowej. Pan mgr Grzegorz Smołucha wyniki własnych analiz przedstawił na tle badań przeprowadzonych przez innych autorów nad polimorfizmem i ekspresją genów oraz ich wpływu na wartość cech reprodukcyjnych owiec, starając się znaleźć wyjaśnienie dla uzyskanych przez siebie rezultatów. Jedynie w przypadku genu *AMH*, ze względu na ograniczoną liczbę badań wykonanych u owiec uzyskane wyniki odniósł do dotychczasowych osiągnięć uzyskanych u myszy i ludzi. Uważam, że jest to bardzo interesująca część rozprawy, w której Autor podjął się wyjaśnienia różnic w plenności ras owiec na poziomie ekspresji genów i molekularnych przyczyn wpływających na jej wartość.

Rozprawa zakończona jest krótkim posumowaniem oraz czternastoma wnioskami i stwierdzeniami odzwierciedlającymi uzyskane wyniki i odnoszącymi się do celów badań. W mojej ocenie tak sformułowane osiągnięcia bardziej stanowią stwierdzenia niż wnioski, ponieważ zawierają informacje o uzyskanych wynikach, natomiast brak jest wniosków użytecznych.

Podsumowanie

Reasumując stwierdzam, że praca doktorska mgr Grzegorza Smołucha jest cenną, nowatorską i perspektywicznie ważną pozycją piśmiennictwa naukowego. Wnosi oryginalne wyniki, istotnie poszerzające widzę z zakresu genetycznych markerów plenności owiec. Wartość rozprawy powiększa fakt, że opisane w niej wyniki badań dotyczą rodzimych ras, charakteryzujących się różną plennością, w tym dwóch ras objętych programem ochrony zasobów genetycznych, w których praca hodowlana



ukierunkowana jest na doskonalenie cech reprodukcyjnych. Z pewnością będzie to cytowana pozycja literatury naukowej. Wszechstronność przeprowadzonych przez Doktoranta analiz świadczy o dużej wiedzy merytorycznej oraz doskonałym opanowaniu nowoczesnych technik analitycznych i bioinformatycznych. Zgromadzone informacje z zakresu genetyki molekularnej, fizjologii, bioinformatyki umiejętnie powiązane ze sobą są niewątpliwie walorem rozprawy, przez co może być ona dobrym przewodnikiem dla innych badaczy. Wymienione w recenzji nieliczne uwagi mają wyłącznie charakter porządkowy i nie obniżają ogólnej, pozytywnej oceny merytorycznej opracowania.

Wniosek końcowy

Oceniając wysoko poziom naukowy i oryginalność uzyskanych wyników stwierdzam, że praca doktorska mgr Grzegorza Smołucha pt. *Polimorfizm i ekspresja genów kodujących białka z nadrodziny TGF- β w aspekcie plenności owiec* spełnia wymogi określone Ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz. U. z 2016 r. poz. 882, ze zm.) art. 13 ust. 1. Zgłaszam więc wniosek do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Zootechniki PIB w Krakowie o przyjęcie pracy mgr Grzegorza Smołucha bez zastrzeżeń i dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Równocześnie wnioskuję o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.

Prof. dr hab. Urszula Czarnik

