



UNIWERSYTET
PRZYRODNICZY
w Lublinie



WYDZIAŁ
NAUK O ZWIERZĘTACH
I BIOGOSPODARKI

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY W LUBLINIE
WYDZIAŁ NAUK O ZWIERZĘTACH I BIOGOSPODARKI
Dyscyplina: Zootechnika i Rybactwo

mgr Ilona Mazurkiewicz

Rozprawa doktorska
Doctoral dissertation

**Polimorfizm molekularny genów odporności na choroby
wirusowe u norki amerykańskiej (*Neovison vison*)**

*Molecular polymorphism in genes for resistance to viral diseases in American mink
(*Neovison vison*)*

Rozprawa doktorska wykonana w Instytucie Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej

Promotor: Prof. dr hab. Andrzej Jakubczak

Lublin, 2024

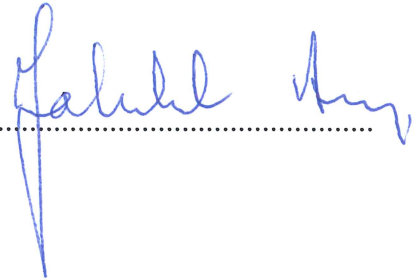
*Serdeczne podziękowania składam
Panu Profesorowi dr hab. Andrzejowi Jakubczakowi
za nieocenioną pomoc, wsparcie merytoryczne oraz wyrozumiałość,
okazywane na każdym etapie mojej pracy naukowej,
której owocem jest niniejsza dysertacja.*

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data 10.12.2024

Podpis promotora



Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadoma odpowiedzialności prawnej oświadczam, że:

- niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przeze mnie samodzielnie pod kierunkiem Promotora i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.
- przedstawiona rozprawa doktorska nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego.
- niniejsza wersja rozprawy doktorskiej jest tożsama z załączoną na płycie CD wersją elektroniczną.

Data 10.12.2024r.

Podpis autora Monika Mazurkiewicz

Spis treści

| | |
|--|-----------|
| Streszczenie | 6 |
| Summary | 8 |
| 1. Wstęp | 10 |
| 1.1. Taksonomia | 11 |
| 1.2. Morfologia gatunku | 11 |
| 1.3. Układ immunologiczny norki amerykańskiej jako przykład funkcjonowania układu odpornościowego ssaków | 12 |
| 1.4. Najważniejsze choroby wirusowe występujące u nerek amerykańskich | 14 |
| 1.5. Odporność nerek na przykładzie choroby aleuckiej | 18 |
| 1.6. Reakcja układu immunologicznego norki na zakażenie AMDV | 21 |
| 1.7. Czynniki wpływające na patogenezę | 23 |
| 1.8. Diagnostyka choroby aleuckiej | 24 |
| 1.9. Charakterystyka genomu norki amerykańskiej | 27 |
| 1.10. Wybrane geny odpowiadające za procesy odpornościowe | 29 |
| 1.10.1. Gen <i>SRSF5</i> | 30 |
| 1.10.2. Gen <i>RNF165 (ARK2C)</i> | 33 |
| 1.10.3. Gen <i>SKOR2</i> | 34 |
| 2. Cel i hipotezy badawcze..... | 36 |
| 3. Materiały i metody..... | 39 |
| 3.1. Materiał biologiczny..... | 39 |
| 3.2. Diagnostyka serologiczna AMDV za pomocą testu CIEP..... | 41 |
| 3.3. Analizy molekularne | 42 |
| 3.3.1. Izolacja materiału genetycznego..... | 42 |
| 3.3.2. Ocena elektroforetyczna wyizolowanego materiału genetycznego | 43 |
| 3.3.3. Potwierdzenie obecności wirusa AMDV metodą PCR, z zastosowaniem starterów dla białek NS1 i VP2 wraz z oceną elektroforetyczną | 43 |
| 3.4. Ocena polimorfizmu pojedynczych nukleotydów (SNP) sekwencji genów <i>SRSF5</i> , <i>RNF165</i> , <i>SKOR2</i> | 45 |
| 3.4.1. Projektowanie starterów do reakcji PCR za pomocą Primer Blast | 45 |
| 3.4.2. Optymalizacja reakcji łańcuchowej polimerazy | 48 |
| 3.4.3. Ocena elektroforetyczna produktów PCR | 49 |
| 3.5. Reakcja sekwencjonowania materiału genetycznego | 50 |
| 3.5.1. Oczyszczanie produktu PCR | 50 |
| 3.5.2. PCR sekwencyjny (asymetryczny) | 50 |
| 3.5.3. Oczyszczanie produktów PCR sekwencyjnego | 51 |
| 3.5.4. Rozdział produktów PCR sekwencyjnego | 51 |
| 3.6. Analiza bioinformatyczna | 52 |
| 3.6.1. Analiza sekwencji nukleotydowych za pomocą programu BLAST | 52 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 3.6.2. | Analiza sekwencji w programie Mega 11 | 53 |
| 3.6.3. | Analiza efektów funkcjonalnych substytucji za pomocą programu SNAP2.. | 53 |
| 4. | Wyniki | 54 |
| 4.1. | Izolacja DNA | 54 |
| 4.2. | Optymalizacja warunków termicznych reakcji PCR | 55 |
| 4.3. | Reakcja łańcuchowej polimerazy | 57 |
| 4.4. | Sekwencjonowanie metodą terminacji łańcucha | 58 |
| 4.5. | Polimorfizm sekwencji genu <i>SRSF5</i> | 64 |
| 4.5.1. | Analiza podobieństwa sekwencji nukleotydowej genu <i>SRSF5</i> | 73 |
| 4.5.2. | Analiza podobieństwa sekwencji aminokwasowej białka <i>SRSF5</i> | 73 |
| 4.5.3. | Porównanie sekwencji aminokwasowych białka będącego produktem ekspresji genu <i>SRSF5</i> | 74 |
| 4.5.4. | Analiza <i>in silico</i> wpływu polimorfizmu p.S229I na funkcjonalność białka <i>SRSF5</i> z wykorzystaniem macierzy heatmap | 75 |
| 4.6. | Polimorfizm sekwencji genu <i>RNF165(ARK2C)</i> | 77 |
| 4.6.1. | Analiza podobieństwa sekwencji nukleotydowej genu <i>RNF165</i> | 86 |
| 4.6.2. | Analiza podobieństwa sekwencji aminokwasowej białka <i>RNF165</i> | 86 |
| 4.6.3. | Porównanie sekwencji aminokwasowych białka będącego produktem ekspresji genu <i>RNF165</i> | 87 |
| 4.6.4. | Analiza <i>in silico</i> wpływu polimorfizmu na funkcjonalność białka <i>RNF165</i> z wykorzystaniem macierzy heatmap | 88 |
| 4.7. | Polimorfizm sekwencji genu <i>SKOR2</i> | 90 |
| 4.7.1. | Analiza podobieństwa sekwencji nukleotydowej genu <i>SKOR2</i> | 101 |
| 4.7.2. | Analiza podobieństwa sekwencji aminokwasowej białka <i>SKOR2</i> | 101 |
| 4.7.3. | Porównanie sekwencji aminokwasowych białka będącego produktem ekspresji genu <i>SKOR2</i> | 102 |
| 4.7.4. | Analiza <i>in silico</i> wpływu polimorfizmu na funkcjonalność białka <i>SKOR2</i> z wykorzystaniem macierzy heatmap | 103 |
| 5. | Dyskusja | 104 |
| 6. | Podsumowanie i wnioski | 126 |
| 7. | Bibliografia | 128 |
| | Załączniki | 148 |

Streszczenie

Norka amerykańska (*Neogale vison*, wcześniej znana jako *Neovison vison*) to gatunek drapieżnego ssaka z rodziny łasicowatych *Mustelidae*. W Europie spotykany jest w formie dzikiej, jak i fermowej. Ze względu na walory estetyczne okrywy włosowej norki są hodowane jako zwierzęta futerkowe. Rosnące koszty oraz pojawiające się choroby stanowią kluczowe wyzwania zootechniczne w hodowli norek w ostatnich latach.

Choroby wirusowe obniżają zyski z hodowli, jak również dobrostan zwierząt. Częstą chorobą norek amerykańskich jest przewlekła i nieuleczalna choroba aleucka AD (*Aleutian Disease*) wywołwana przez wirusa choroby aleuckiej norek AMDV (*Aleutian Mink Disease Virus*). Jest ona groźną chorobą zakaźną między innymi z uwagi na silną supresję układu immunologicznego w organizmach norek, ostry przebieg oraz wysoką śmiertelność wśród osesków. Łatwość rozprzestrzeniania się wirusa oraz jego wysoka trwałość w środowisku w znaczącym stopniu utrudnia działania dążące do eliminacji patogenu z ferm, co zmusza do poszukiwania metod swoistej profilaktyki.

Dotychczasowe próby opracowania skutecznej szczepionki przeciwko AMDV zakończyły się niepowodzeniem (Markarian i Abrahamyan, 2021). Brak profilaktyki swoistej stwarza potrzebę wdrożenia strategii minimalizujących straty hodowlane z powodu choroby aleuckiej. W tej sytuacji jedną z możliwych strategii uwalniania ferm norek od choroby aleuckiej jest selekcja genetyczna norek w kierunku zwiększonej odporności na zakażenie.

Znalezienie sygnatur selekcji w odpowiedzi na zakażenie wirusem choroby norek aleuckiej było celem badań Karimi i wsp. (2021a), którzy zidentyfikowali geny mogące pełnić rolę prognostycznych wskaźników odpowiedzi immunologicznej norek na obecność wirusa AMD, sugerując, że geny te są silnymi kandydatami do selekcji norek tolerujących chorobę aleucką (AD). Autorzy Ci stwierdzili, że geny *SRSF5*, *RNF165*, *SKOR2* znajdują się na dwóch odcinkach genomu złożonych z contigów uzyskanych z sekwencjonowania całogenomowego: scaffold 1: 23,046,774–23,187,210 pz oraz scaffold 2: 23,424,424–23,969,935 pz.

Na podstawie studium piśmiennictwa wybrano z pracy Karimi i wsp. (2021a) geny *SRSF5*, *RNF165* i *SKOR2*. Gen *SRSF5* (*Serine and Arginine Rich Splicing Factor 5*) uczestniczy w procesach splicingu RNA, które mogą mieć kluczowe znaczenie w regulacji ekspresji genów zaangażowanych w odpowiedź przeciwwirusową. Gen *RNF165* (*RING Finger Protein 165*), poprzez swoją aktywność jako ligaza ubikwitynowa, może wpływać na degradację białek wirusowych, natomiast *SKOR2* (*SKI Family Transcriptional Corepressor 2*) pełni funkcję korepresora transkrypcyjnego, regulując ścieżki sygnalizacji odpornościowej.

Zsekwencjonowanie ich pozwoliło na wskazanie polimorfizmów typu SNP we wszystkich badanych genach. W ramach przeprowadzonych badań stwierdzono w obrębie genu *SRSF5* transwersję 173A>C, insercję 758ins.T i mutację o niesynonimicznym charakterze 916G>T (p.S229I) u norek hodowlanych. Gen *RNF165* charakteryzował się dwoma polimorfizmami, pierwszy w pozycji 141A>G miał charakter synonimiczny, drugi w pozycji 596A>G (p.R199K) był mutacją typu missens. W genie *SKOR2* stwierdzono dwie mutacje niesynonimiczne w pozycji 3000A>T (p.K1000N) oraz 3017A>G (p.H1006R).

Stwierdzono zróżnicowanie wyników uzyskanych na podstawie sekwencjonowania wysokoprzepustowego (NGS) z bazy Ensembl a wynikami badań własnych uzyskanych metodą sekwencjonowania Sangera w zakresie analizowanych genów.

Występujące polimorfizmy genetyczne wpływając na efekt funkcjonalny kodowanych białek, prowadzą do potencjalnych zmian w ich strukturze lub funkcji. Stwierdzono umiarkowany efekt funkcjonalny polimorfizmu w genie *SRSF5* 916G>T(p.S229I) oraz w genie *RNF165* 596A>G (p.R199K) na uzyskane białko. Gen *SKOR2* cechował się uzyskaniem negatywnego efektu funkcjonalnego polimorfizmu 3000A>T(p.K1000N) oraz neutralnego w odniesieniu do polimorfizmu 3017A>G(p.H1006R).

Słowa kluczowe: norka amerykańska, choroba aleucka, genetyczne markery odporności, *SRSF5*, *RNF165*, *SKOR2*

Summary

The American mink (*Neogale vison*, previously known as *Neovison vison*) is a carnivorous mammal species from the *Mustelidae* family. In Europe, it occurs in both wild and farmed forms. Due to the aesthetic qualities of its fur, minks are bred as fur animals. Increasing costs and emerging diseases have been the main zootechnical challenges in mink farming in recent years.

Viral diseases reduce farming profitability and compromise animal welfare. A common disease of American mink is Aleutian Disease (AD), a chronic and incurable condition caused by the Aleutian Mink Disease Virus (AMDV). AD poses a significant threat as it leads to severe immunosuppression, acute progression, and high mortality among mink kits. The ease of viral transmission and its environmental persistence considerably hinder efforts to eliminate the pathogen from farms, necessitating the search for specific prophylactic measures. However, all attempts to develop an effective AMDV vaccine have failed (Markarian & Abrahamyan, 2021). The lack of specific prophylaxis highlights the need for strategies to mitigate breeding losses due to AD. One possible strategy is genetic selection for increased resistance to infection.

Karimi et al. (2021a) investigated signatures of selection in response to AMDV infection and identified genes that could serve as prognostic markers of minks' immune response to AMDV. These genes are strong candidates for selective breeding of minks tolerant to AD. The identified genes, *SRSF5*, *RNF165*, and *SKOR2*, are located in two genomic regions comprising contigs from whole-genome sequencing: scaffold 1: 23,046,774–23,187,210 bp and scaffold 2: 23,424,424–23,969,935 bp.

Based on the literature, *SRSF5*, *RNF165*, and *SKOR2* were selected from Karimi et al.'s (2021a) study for further analysis. The *SRSF5* (*Serine and Arginine Rich Splicing Factor 5*) gene is involved in RNA splicing processes, which are potentially critical in regulating the expression of genes involved in antiviral responses. The *RNF165* (*RING Finger Protein 165*) gene, acting as a ubiquitin ligase, may influence the degradation of viral proteins, while *SKOR2* (*SKI Family Transcriptional Corepressor 2*) functions as a transcriptional corepressor regulating immune signaling pathways. Sequencing these genes revealed single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in all the studied genes.

In the conducted study, several polymorphisms were identified. In the *SRSF5* gene, these included a 173A>C transversion, a 758ins.T insertion, and a nonsynonymous 916G>T mutation (p.S229I) in farmed minks. The *RNF165* gene exhibited two polymorphisms: one synonymous at position 141A>G and one missense mutation at 596A>G (p.R199K). The *SKOR2* gene

contained two nonsynonymous mutations at positions 3000A>T (p.K1000N) and 3017A>G (p.H1006R).

A divergence was observed between the high-throughput sequencing (NGS) results from the Ensembl database and those obtained using the Sanger sequencing method in the analyzed genes. Genetic polymorphisms were found to impact the functional effects of the encoded proteins, leading to potential changes in their structure or function. Moderate functional effects were observed for the *SRSF5* 916G>T (p.S229I) and *RNF165* 596A>G (p.R199K) polymorphisms. For the *SKOR2* gene, a negative functional effect was associated with the 3000A>T (p.K1000N) polymorphism, while a neutral effect was linked to the 3017A>G (p.H1006R) polymorphism.

Keywords: American mink, Aleutian Disease, genetic markers of immunity, *SRSF5*, *RNF165*, *SKOR2*

1. Wstęp

Norka amerykańska (*Neogale vison*, wcześniej znana jako *Neovison vison*) to gatunek drapieżnego ssaka z rodziny łasicowatych *Mustelidae* (Abramov, 2000; Karimi i wsp., 2022). W Europie spotykany jest w formie dzikiej, jak i fermowej (Piórkowska i Kowalska, 2014). Nie ma zbyt wielu informacji na temat historii udomowienia norek amerykańskich. Pierwsze próby hodowli norek zostały zapoczątkowane w 1866 roku w celu uzyskania od nich futra (Karimi, 2021b). Ze względu na walory estetyczne okrywy włosowej norki są hodowane jako zwierzęta futerkowe.

Większość ferm skupia się na uzyskaniu norek o określonym umaszczeniu. Jednak podstawowym kryterium w odniesieniu do odmian kolorystycznych hodowanych na fermie jest zapotrzebowanie rynkowe (moda). Wielkość skóry, jakość futra, wydajność reprodukcyjna i odporność na choroby to główne cechy interesujące hodowców norek (Hu i wsp., 2020; Do i Miar, 2019; Karimi i wsp., 2018). Wdrożenie wysoce wydajnych strategii hodowlanych ma kluczowe znaczenie dla przyjęcia przez hodowców norek zrównoważonych praktyk produkcyjnych, np. zwiększenia odporności na pojawiające się choroby, rozwiązania problemów etycznych związanych z produkcją futer i obniżenia kosztów produkcji (Karimi i wsp., 2018). Pomimo udanego wykorzystania podejść selekcji genomowej w celu poprawy wartości genetycznych u innych gatunków zwierząt gospodarskich, np. bydła mlecznego (Wiggans i wsp., 2017) i świń (Knol i wsp., 2016), ta strategia hodowlana nie została zastosowana w hodowli norek. Dane dotyczące sekwencji całego genomu dostarczają informacji na temat polimorfizmu SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), które mogą być wykorzystane do nowoczesnej selekcji genomowej (Davey i wsp., 2011; Karimi i wsp., 2019; Karimi i wsp., 2021b).

Rosnące koszty i pojawiające się choroby są najważniejszymi wyzwaniami zootechnicznymi w hodowli norek w ostatnich latach (Karimi i wsp., 2022). Choroby wirusowe obniżają zyski z hodowli, jak również dobrostan zwierząt. Częstą chorobą norek amerykańskich jest przewlekła i nieuleczalna choroba aleucka AD (*Aleutian Disease*) wywoływana przez wirusa choroby aleuckiej norek AMDV (*Aleutian Mink Disease Virus*). Jest ona groźną chorobą zakaźną między innymi z uwagi na silną supresję układu immunologicznego w organizmach norek, ostry przebieg oraz wysoką śmiertelność wśród osesków (Reichert i Kostro, 2014b). Łatwość rozprzestrzeniania się wirusa oraz jego wysoka trwałość w środowisku w znaczącym stopniu utrudnia działania dążące do eliminacji patogenu z ferm (Christensen i wsp., 2011), co zmusza do poszukiwania metod swoistej profilaktyki. Dotychczasowe próby opracowania

skutecznej szczepionki przeciwko AMDV zakończyły się niepowodzeniem (Markarian i Abrahamyan, 2021). Brak profilaktyki swoistej stwarza potrzebę wdrożenia strategii minimalizujących straty hodowlane z powodu choroby aleuckiej. W tej sytuacji jedną z możliwych strategii uwalniania ferm norek od choroby aleuckiej jest selekcja genetyczna norek w kierunku zwiększonej odporności na zakażenie.

1.1. Taksonomia

Pod względem taksonomicznym norka amerykańska (*Neogale vison*, wcześniej znana jako *Neovison vison*) zaliczana jest do rzędu ssaków drapieżnych *Carnivora* oraz obok łasic, kun, tchórz, wydr i borsuków do rodziny łasicowatych *Mustelidae*. Norka amerykańska została opisana przez niemieckiego zoologa Johanna von Schrebera w 1777 roku. Wraz z rozwojem nowych technik molekularnych stosowanych do badań filogenetycznych poddano rewizji taksonomiczne przyporządkowanie oraz ocenę stopnia pokrewieństwa norki z innymi gatunkami. Początkowo norka amerykańska była zaliczana do rodzaju *Mustela* wraz z takimi gatunkami jak: norka europejska *Mustela lutreola*, tchórz *Mustela putorius* czy łasica *Mustela nivalis*. Jednak z uwagi na różnice genetyczne, wydzielono norkę amerykańską z rodzaju *Mustela*, tworząc oddzielny takson - rodzaj *Neovison* (Zalewski i Brzeziński, 2014). Niektórzy naukowcy wskazując na bliższe podobieństwo norki amerykańskiej do łasicy długoogoniastej *Mustela frenata* (niż do norki europejskiej czy tchórza), łączą te dwa gatunki w jeden kład – rodzaj *Neovison*. Inna teza zakłada, że amerykański kład (*M. vison*, *M. frenata*, *M. felipei*, *M. africana*) został przeniesiony do rodzaju *Neogale* (Patterson i wsp., 2021).

1.2. Morfologia gatunku

Norka amerykańska jest ssakiem o typowej dla większości łasicowatych wysmukłej sylwetce i krótkich pięciopalczastych kończynach, zakończonych długimi, lekko zakrzywionymi pazurami. Palce u nasady spina fałd skórny. Ogon jest krótszy niż połowa długości ciała. Na długiej szyi jest osadzona względnie nieduża głowa z krótkim pyskiem, wokół którego wyrastają włosy czuciowe, a więc wibrysy. Oczy norek mają ciemnobrązowe tęczówki. Uszy są krótkie, zaokrąglone i szeroko rozstawione na głowie (Zalewski i Brzeziński, 2014; Kowalska i Gugolek, 2017).

Norki amerykańskie są ubarwione jednolicie, aczkolwiek sierść poszczególnych osobników może mieć różne odcienie. W populacjach dzikich spotyka się zwykle zwierzęta o sierści jasnobrązowej, czekoladowo-brązowej lub ciemnobrązowej z czarnym odcieniem. W

obrębie populacji mogą występować różne kolory sierści białe plamy na spodzie łap, na dolnej wardze, gardle, piersi, brzuchu, u nasady kończyn. Ich liczba, kształt i wielkość wykazują dużą zmienność, toteż ich rozmieszczenie, kształt i wielkość stanowi cechę osobniczą pozwalającą odróżnić jedno zwierzę od drugiego. Natomiast niewielkie i nieliczne plamy uniemożliwiają pewną identyfikację osobnika (Zalewski i Brzeziński, 2014).

1.3. Układ immunologiczny norki amerykańskiej jako przykład funkcjonowania układu odpornościowego ssaków

Układ odpornościowy to złożona sieć narządów limfatycznych, komórek, czynników humoralnych i cytokin, której podstawowym zadaniem jest ochrona organizmu przed patogenami. Dysfunkcje układu odpornościowego prowadzą do ciężkich infekcji, chorób autoimmunologicznych lub alergicznych. Układ odpornościowy dzieli się na wrodzony i adaptacyjny. Odporność wrodzona obejmuje bariery fizyczne oraz komórki, takie jak neutrofile i makrofagi, które reagują szybko, ale niespecyficznie. Z kolei odporność adaptacyjna, rozwijająca się wolniej, opiera się na precyzyjnej odpowiedzi limfocytów T i B, które zapamiętują patogeny, umożliwiając szybszą reakcję przy ponownym kontakcie (Parkin i Cohen, 2001).

Podobnie jak u innych gatunków ssaków układ odpornościowy u norki amerykańskiej zbudowany jest z: narządów limfatycznych ośrodkowych, takich jak grasica i szpik kostny oraz obwodowych, a więc śledziony i węzłów chłonnych, tkanki chłonnej w śluzówce przewodu pokarmowego GALT (*gut associated lymphoid tissue*), układu oddechowego BALT (*bronchus associated lymphoid tissue*) oraz skóry SALT (*skin associated lymphoid tissue*), jak i komórek wędrujących między krwią, limfą a innymi tkankami. Wśród tych komórek wymienić należy: limfocyty, monocyty oraz makrofagi, komórki wtórnie zaangażowane, a więc neutrofile, bazofile, acidofile oraz komórki NK (*natural killers*) (Gieryńska i Kalinowska-Gacek, 2009). Dodatkowo układ chłonny nerek tworzą związki biologicznie czynne, takie jak immunoglobuliny, układ antygenów (jako produkt głównego kompleksu zgodności tkankowej MHC (*major histocompatibility complex*), swoiste i nieswoiste mediatory reakcji immunologicznych (limfokiny, interferony, interleukiny), układ dopełniacza, układ properdyny i lizozym (Gliński i Kostro, 2002).

Procesy takie jak aktywacja neutrofilii, produkcja cytokin i wybuch tlenowy są kluczowe dla eliminacji patogenów, choć mogą prowadzić do stanów zapalnych. Reakcja zależna od tlenu, nazywana także wybuchem tlenowym (*respiratory burst*) jest to mechanizm obronny

polegający na produkcji reaktywnych form tlenu (ROS, *Reactive Oxygen Species*) przez oksydazę NADPH. W komórkach układu odpornościowego - głównie neutrofilach i makrofagach - w odpowiedzi na infekcję powstają toksyczne metabolity tlenu, takie jak nadtlenek wodoru, rodniki hydroksylowe i tlen singletowy zdolne do niszczenia patogenów (Allen i Tresini, 2000; Parkin i Cohen, 2001).

System dopełniacza, obejmujący kaskadową aktywację białek, wspiera reakcje immunologiczne, prowadząc do lizy patogenów oraz zwiększania przepuszczalności naczyń. Kluczową rolę w odpowiedzi przeciwpasożytniczej pełnią eozynofile, natomiast komórki tuczne i bazoofile uczestniczą w reakcjach alergicznych poprzez uwalnianie mediatorów zapalnych, takich jak histamina. Komórki NK eliminują zainfekowane lub nowotworowe komórki poprzez mechanizmy cytotoksyczne niezależne od specyficznego rozpoznawania antygeny (Parkin i Cohen, 2001).

Układ odpornościowy wrodzony odróżnia patogeny od własnych komórek dzięki receptorom rozpoznającym wzorce molekularne związane z patogenami (PAMP, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*). Receptory te dzielą się na trzy grupy: wywołujące endocytozę, opsoniny oraz inicjujące transdukcję sygnałów, jak receptory Toll-podobne (TLR, *Toll-like receptors*). Choć wrodzona odporność skutecznie eliminuje bakterie, ma ograniczone możliwości walki z wirusami, a także może powodować uszkodzenie tkanek (Parkin i Cohen, 2001; Wicherska-Pawłowska, i wsp., 2021).

Procesy zapalne wymagają rekrutacji i aktywacji komórek w miejscu infekcji, co odbywa się dzięki interakcji receptorów komórkowych, cytokin i cząsteczek adhezyjnych. Cząsteczki adhezyjne, takie jak selektyny, integryny i kadheryny, pośredniczą w przyczepianiu i migracji komórek, reorganizując cytoszkielet i aktywując mechanizmy wewnątrzkomórkowe (Parkin i Cohen, 2001; Zhang i Wang, 2012). Migracja neutrofilów to przykład koordynacji tych mechanizmów. Chemokiny pobudzają śródbłonek do wytwarzania selektyn, które umożliwiają neutrofilom przemieszczanie się wzdłuż naczyń. Integryny wzmacniają ich przyczepienie, co pozwala umożliwić neutrofilom diapedezę, czyli przenikanie przez ścianę naczyń do tkanek. Niedobory cząsteczek adhezyjnych, jak w deficycie integryn $\beta 2$, skutkują ciężkimi infekcjami, mimo nadmiaru neutrofilów we krwi. Cytokiny to niewielkie cząsteczki sygnałowe, które regulują aktywność układu odpornościowego. Są one wydzielane przez różne komórki i wiążą się z receptorami powierzchniowymi, wpływając na aktywację, podział, ruch i apoptozę komórek. W zależności od funkcji, cytokiny mogą działać lokalnie (parakrynnie), na siebie (autokrynnie) lub systemowo (endokrynnie). Wyróżniamy różne rodzaje cytokin: interleukiny, chemokiny, interferony oraz czynniki stymulujące tworzenie kolonii. Interferony pełnią szczególną rolę w

odporności przeciwwirusowej (Commins i wsp. 2010). Typ 1 (α i β) hamuje replikację wirusów, zwiększa ekspresję MHC klasy I oraz aktywuje limfocyty T. Natomiast typ 2 (γ) aktywuje makrofagi, neutrofile i komórki NK, wspierając odporność w zakażeniach makrofagowych (Parkin i Cohen, 2001).

Specyficzna odpowiedź immunologiczna opiera się na aktywacji limfocytów T i B przez antygeny, co prowadzi do precyzyjnych odpowiedzi efektorowych. Limfocyty T i B rozwijają się w grasicy i szpiku, a następnie zasiedlają wtórne narządy limfatyczne, takie jak węzły chłonne czy śledziona. Tam, dzięki interakcji z antygenami oraz mikrośrodowisku bogatemu w cytokiny i cząsteczki adhezyjne, dochodzi do ich aktywacji. Aktywacja limfocytów T wymaga prezentacji antygeny przez cząsteczki MHC. W grasicy odbywa się selekcja limfocytów, zapewniająca rozpoznawanie antygenów obcych bez nadmiernej reaktywności wobec własnych tkanek. Proces ten pozwala na skuteczną i kontrolowaną odpowiedź immunologiczną (Chen i Aasted, 1998; Parkin i Cohen, 2001).

1.4. Najważniejsze choroby wirusowe występujące u nerek amerykańskich

Według Wilson i wsp. (2015) choroba aleucka nerek jest jedną z głównych przyczyn zejść śmiertelnych nerek. W swoich badaniach opierając się na ustaleniach przyczyny śmierci na podstawie 339 przypadków stwierdzili, że 52 z nich (co stanowiło 13,9%) było spowodowane wystąpieniem krwotocznego zapalenia płuc wywołanego infekcją bakterią *Pseudomonas aeruginosa*. Drugą pod względem liczebności przyczyną zgonów była choroba aleucka nerek wywołana przez wirusa AMDV (51/13,7%). Należy to tej liczby dodać przypadki powikłań infekcji AMDV w postaci krwotocznego zapalenia płuc, koinfekcji *Salmonella spp.* wywołującym bakteryjne zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych oraz *E.coli* skutkującą posocznicą, a także zapaleń układu moczowego, czego efektorowo skutkiem jest kamica moczowa. Sumarycznie stanowi to 17,7%. Wyższym wskaźnikiem śmiertelności charakteryzuje się jedynie bakteryjne zapalenie płuc, wraz z jego koinfekcjami co stanowi 18,8%. Kolejnymi istotnymi przyczynami zejść w badaniach Wilsona i wsp. (2015) były: wirusowe zapalenie jelit nerek (16,2%), lipidoza wątroby (8,1%), miopatia żywieniowa (7%). Pozostałe przyczyny nie przekroczyły poziomu 5%. Warto podkreślić, że u części zwierząt (4,3%) podejrzewano zatrucie jadem kiełbasianym na podstawie wywiadu klinicznego, ale nie można było tego potwierdzić badaniami laboratoryjnymi. Do metod zwalczania i zapobiegania najczęstszym przyczyn śmierci nerek hodowlanych można zaliczyć: testowanie i eliminację zwierząt z wynikami dodatnimi w przypadku choroby aleuckiej nerek, wakcynację przeciwko zapaleniu płuc wywołanemu przez *Pseudomonas aeruginosa* oraz wirusowemu zapaleniu jelit,

a także unikanie błędów żywieniowych prowadzących do otyłości, a w konsekwencji do rozwoju lipidozy wątroby (Wilson i wsp., 2015).

W ostatnich latach coraz częściej przyczynami strat wśród hodowlanych nerek amerykańskich są również astrowiroza, nosówka i SARS-CoV-2.

Jak podają Bidokhti i wsp. (2019), Wildi i Seuberlich (2021) oraz De Benedictis i wsp. (2011) astrowirusy infekują szeroki zakres gospodarzy, należących do różnych gatunków, tj. ludzi (HastVs 1-8), bydła (BoAstV), owiec (OAstV), alpaka (BoAstV CH13/NeuroS1) świń (PoAstV), kotów (FeAstV), psów (CaAstV), ssaków morskich takich jak: lew morski kalifornijski (CslAstV-1, CslAstV-2, CslAstV-3), lew morski Stelleria (SslAstV) i delfin butlonosy (BdAstV), a także indyków (TAstV), kaczek (DAstV) i kur (CAstV). Czynnikiem etiologicznym infekcji u nerek jest wirus MAstV-1 (Tao i wsp., 2022; De Benedictis i wsp., 2011), należący do rodziny *Astroviridae* (Hammer i wsp., 2012). W przypadku, gdy patogen po wnikięciu do organizmu norki wykazuje tropizm w kierunku tkanki nerwowej (neurotropizm), rozwija się zespół drżących nerek (SMS- *shaking mink syndrome*). Dwa kolejne obrazy kliniczne choroby, a więc zespół przedodsadzeniowej biegunki nerek (PMD – *pre-weaning mink diarrhoea*) oraz zespół mokrych nerek (WMS – *wet mink syndrome*), ze względu na wysoką zbieżność objawów, często są uznawane za jedną jednostkę chorobową (Gliński i Kostro, 2012; Hammer i wsp., 2012; Kowalczyk i Jakubczak, 2016; Jakubczak i wsp., 2021).

Charakterystycznym objawem jest biegunka o kale konsystencji od śluzowatej do lepkiej oraz nadmierna aktywność gruczołów łojowych i potowych okolicy szyjnej skutkujące dużym odsetkiem padnięć. Czynniki zwiększającymi prawdopodobieństwo zakażenia mogą być m.in.: nadmierna liczebność stada, niedostateczna higiena, intensywne karmienie w czasie ciąży, *mastitis* gruczołu mlekowego karmiących samic czy koinfekcje reowirusowe i kaliciwirusowe (Gliński i Żmuda, 2019).

Materiałem genetycznym astrowirusa nerek jest jednoniciowy RNA o polaryzacji dodatniej (ssRNA+) i długości od 6,8 do 7,9 kb. Wirus dostaje się do komórki poprzez endocytozę zależną od klatryny (Gliński i Żmuda, 2019). Białko CP będąc zewnętrzną barierą strukturalną, otacza kwasy nukleinowe, ale także wchodzi w interakcje z gospodarzem, wpływając na tropizm komórkowy. Ponadto pośredniczy we wnikięciu do komórki oraz pełni rolę antygeny, który indukuje odpowiedź immunologiczną u gospodarza (Mendez i wsp., 2007). Dlatego też wirus może mieć różny przebieg, w zależności od rodzaju wirusa i odpowiedzi immunologicznej organizmu.

Jedną z częściej spotykanych chorób wirusowych u nerek amerykańskich, zarówno dziko żyjących, jak i hodowlanych na fermach jest nosówka. Występuje u prawie wszystkich

gatunków *Carnivora*, w tym lisów, jenotów oraz nerek (Liang i wsp., 2024). Czynnikiem etiologicznym choroby jest wirus nosówki CDV (*canine distemper virus*) (Kopczewski i wsp., 2009; Adaszek i wsp., 2012). Wirus ten należy do rodzaju *Morbillivirus* klasyfikowanego w obrębie rodziny *Paramyxoviridae*. Materiał genetyczny wirusa CDV stanowi ssRNA o wielkości około 15 616 nukleotydów, ujemnie spolaryzowany i zawierający polimerazę RNA (Adaszek i wsp., 2012). Genom zawiera sześć genów kodujących: dwa białka biorące udział w replikacji - fosfoproteinę P i białko L, białko nukleokapsydu-N, białko osłonki (M), dwie glikoproteiny hemaglutyninę-H CDV oraz białko fuzyjne F. Porównując sekwencje poszczególnych genów pomiędzy referencyjnymi szczepami a izolatami wirusa nosówki wykazano, że najczęściej różnice występują w obrębie genów hemaglutyniny, białka fuzyjnego F oraz nukleoproteiny. Polimorfizmy molekularne występujące w obrębie tych genów mogą być przyczyną zmian w zjadliwości wirusa prowadzących do pojawiania się objawów nosówki, zwłaszcza u psów, mimo powszechnie prowadzonego programu szczepień (Adaszek i wsp., 2012). Jednostka ta z uwagi na istnienie skutecznej immunizacji wydaje się nie być, aż tak szczególnym zagrożeniem epizootycznym. Jednak jak podaje Wang i wsp. (2023) badając strukturę, funkcje oraz antygenowość białka H konieczne jest dalsze projektowanie szczepionek przeciwko CDV oraz modyfikacja technologii diagnostycznych z uwagi na występowanie mutacji, które wywołują niepełną odpowiedź immunologiczną organizmu a w odniesieniu do testów mogą dawać wyniki fałszywie ujemne.

Wirus jest amplifikowany i wydzielany z komórek nabłonkowych układu oddechowego, pokarmowego i moczowego zakażonego zwierzęcia. Białka wirusowe hamują mechanizmy odporności wrodzonej w komórce gospodarza (Zhao i wsp., 2015). Chorobie towarzyszą różnorodne objawy, między innymi żołądkowo-jelitowe, ropne wysięki z oczu i nosa, zapalenie spojówek z obrzękiem zmniejszającym szparę oczu, zgrubienie opuszek palcowych (choroba twardej łapy) czy zaburzenia nerwowe (drgawki, zaburzenia równowagi, niedowład kończyn szczególnie tylnych). Zgodnie z wynikami badań epidemiologicznych przeprowadzonych w Chinach norki są mniej podatne na CDV niż jenoty i lisy (Zhao i wsp., 2015).

Norka amerykańska była pierwszym gatunkiem wśród łasicowatych (*Mustelidae*), u którego potwierdzono obecność wirusa SARS-CoV-2 (Aguiló-Gisbert i wsp., 2021). Do 2023r. wirus ten został wykryty u nerek hodowlanych w 13 różnych krajach (Hansen i wsp., 2023). Ze względu na wysoką podatność nerek na zakażenie i zdolność do transmisji wirusa wśród tych zwierząt, pojawiły się obawy, że norki mogą służyć jako rezerwuar do generowania nowych wariantów SARS-CoV-2 o nieznanej zjadliwości i właściwościach antygenowych (Oreshkova i wsp., 2020). Patterson i wsp. (2020), Sailleau i wsp. (2020) Sit i wsp. (2020), Shi

i wsp. (2020), Zhang i wsp. (2020) stwierdzili występowanie wirusa SARS- Co-V-2 u psów i kotów oraz u dzikich kotowatych w ogrodzie zoologicznym (Gollakner i Capua, 2020). Inne gatunki, takie jak świnie i drób, wydają się odporne (Du i wsp., 2021, Schlottau i wsp., 2020, Shi i wsp., 2020, Suarez i wsp., 2020). Natomiast bydło wykazuje niską podatność na zakażenie SARS-CoV-2 (Ulrich i wsp., 2020). Jak podaje Du i wsp. (2021) w najczęściej stosowanych modelach zwierzęcych COVID-19, to jest chomików, fretek, kotów oraz ssaków naczelnych nie występują żadne poważne objawy kliniczne.

W badaniu przeprowadzonym przez Hansen i wsp. (2023) w Kanadyjskim Centrum Badań nad Zwierzętami Futerkowymi (*Canadian Center for Fur Animal Research, CCFAR*), Dalhousie University (Truro, Kanada) oceniono odpowiedź immunologiczną nerek hodowlanych po szczepieniu komercyjną szczepionką opartą na białku *spike* wirusa SARS-CoV-2. Szczepionka ta była pierwotnie zatwierdzona do stosowania u kotów, a w badaniu porównano odpowiedź immunologiczną nerek z hodowli kanadyjskich z odpowiedzią obserwowaną po naturalnym zakażeniu u duńskich nerek hodowlanych. Wyniki wykazały, że szczepionka wywołała silną odpowiedź przeciwciał, z poziomami miana sięgającymi 1:12800 w teście ELISA. U nerek zaszczepionych odnotowano wysoki poziom przeciwciał neutralizujących, które wykazywały zdolność do neutralizacji zarówno przodków wirusa, jak i nowszych wariantów takich jak Omicron BA.4, pomimo znacznych różnic genetycznych między tymi szczepami. Oznacza to, że szczepionka zastosowana u nerek hodowlanych w Kanadzie była w stanie wywołać silną i szeroko reagującą odpowiedź przeciwciał, co może ograniczyć rozprzestrzenianie się SARS-CoV-2 u nerek hodowlanych, a tym samym zmniejszyć ryzyko, że norki będą służyć jako rezerwuuar wirusa dla zakażeń u ludzi (Hansen i wsp., 2023). Pomimo wykrycia SARS-CoV-2 w wielu krajach, tj. w Stanach Zjednoczonych, Francji, Grecji, Włoszech, Hiszpanii, Szwecji, Polsce, na Litwie, w Kanadzie, Holandii oraz Danii (Fenollar i wsp., 2021), tylko w dwóch ostatnich krajach podjęto decyzję o uboju wszystkich nerek z ferm, w tym zwierząt wolnych od wirusa (Grabowska i Adamczyk-Popławska, 2021). Wybicie 15 milionów nerek w Dani oraz ponad 1 milion nerek w Holandii (Oreshkova i wsp., 2020) wydaje się być decyzją wyolbrzymioną, gdyż wprowadzona w innych krajach kwarantanna okazała się wystarczającą metodą walki z SARS-CoV-2.

1.5. Odporność nerek na przykładzie choroby aleuckiej

Wirus choroby aleuckiej nerek (AMDV, *Aleutian Mink Disease Parvovirus*) należy do rodzaju *Amdoparvovirus* w rodzinie *Parvoviridae* i podrodzinie *Parvovirinae* (Kostro i wsp., 1999; Cotmore i wsp., 2014). Głównymi gospodarzami wirusa AMDV są norki amerykańskie, a wskaźnik zakażeń w populacjach dziko żyjących wynosi ponad 90% (Farid, 2013). Obecność wirusa potwierdzono także u innych członków rodziny łasicowatych (*Mustelidae*) w tym łasic krótkoogonowych i kun, a także u przedstawicieli innych rodzin, takich jak kotowate (*Felidae*) - ryś oraz psowate (*Canidae*) - lis polarny i lis rudy. Wirus ten został również wykryty u szopów oraz skunksów pasiastych (Canuti i wsp., 2020). Opublikowano także przypadki zakażeń AMDV u ludzi z osłabionym układem odpornościowym, którzy mieli długotrwały kontakt z zakażonymi zwierzętami (Jepsen i wsp., 2009).

Z uwagi na brak skutecznej immunizacji oraz leczenia aktualnym problemem w hodowli nerek amerykańskich jest choroba aleucka (Makarjian i Abrahamyan, 2021). Jest ona przewlekłą i nieuleczalną chorobą generującą duże straty ekonomiczne w hodowli nerek. Na zajętych wirusem fermach można zaobserwować niską plenność zwierząt, częste ronienia, wysoką śmiertelność osesków w pierwszych dniach po urodzeniu, a także liczne upadki kilkumiesięcznych nerek (Kowalczyk i Jakubczak, 2015).

Czynnikiem etiologicznym choroby jest bezoczkowy parwowirus (AMDV), którego wiriony mają średnicę 23–25 nm (Kostro i wsp., 1999). Genom wirusa stanowi lewoskrętny jednoniciowy DNA (ssDNA) o długości 4,5–5 kb (Karimi i wsp., 2021a). Zawiera on dwie główne otwarte ramki odczytu (ORF) i palindromowe spinki do włosów na końcach 3' i 5' (Huang i wsp., 2014; Xi i wsp., 2016). Genom wirusa składa się z dwóch głównych regionów (kaset) genowych (Cotmore i Tattersall, 2014). Region na końcu 5' genomu odpowiada za kodowanie białek niestrukturalnych NS1-3, które powstają w wyniku alternatywnego splicingu, natomiast region na końcu 3' ORF koduje białko kapsydu. Białka NS odgrywają kluczową rolę w regulacji późnych etapów syntezy białek strukturalnych oraz replikacji wirusowego materiału genetycznego (Alexandersen i wsp., 1988; Tong i wsp., 2020; Xi i wsp., 2016; Kondracki i wsp., 2023). Kapsyd AMDV składa się z dwóch białek strukturalnych – głównego VP2 oraz pomocniczego VP1. Oba białka pełnią funkcję głównych antygenów wirusa, co czyni je istotnymi w procesach immunologicznych i patogenezie infekcji (Xi i wsp., 2016). Zmiany w sekwencjach genów kodujących białka NS1 i VP2 są szeroko wykorzystywane w badaniach filogenetycznych. Pozwalają one na identyfikację szczepów wirusa oraz badanie jego ewolucji i rozprzestrzeniania w populacjach nerek hodowlanych i dzikich (Jakubczak i wsp., 2016;

Kowalczyk i wsp., 2019; Prieto i wsp., 2020; Ryt-Hansen i wsp., 2017).

Według Christensen i wsp. (1999) oraz Olofsson i wsp. (1999) szczepy wirusa AMD mogą należeć do 4 podtypów, które charakteryzują się między innymi różnym stopniem zjadliwości ze względu na zmienność białek niestrukturalnych. Istotnym czynnikiem jest znalezienie zwierząt w grupach, w których nie ma najbardziej zjadliwych wariantów wirusa, bo tylko takie postępowanie może skutkować skuteczną selekcją zwierząt w kierunku zwiększonej odporności.

Wirus AMDV jest trwały w środowisku oraz uważany za odporny na różne czynniki fizyczne i chemiczne (Hussain i wsp., 2014; 2024). Jest odporny na działanie eteru, chloroformu, butanolu, czterochlorku węgla oraz proteaz i nukleaz. AMDV zachowuje właściwości zakaźne w pH od 3 do 11 w 50°C przez 30 minut (Gliński i Kostro, 2002).

Wirus AMDV jest obecny i szeroko rozpowszechniony w różnych obszarach i elementach ferm zakażonych chorobą aleucką, co sugeruje, że możliwe są nawet po wykonaniu dezynfekcji reinfekcje spowodowane uporczywym utrzymywaniem się AMDV w środowisku fermy (Prieto i wsp., 2017). Wektorami zaangażowanymi w rozprzestrzenianie się AMDV mogą być ogniska zakażeń, takie jak klatki, narzędzia robocze, a nawet ludzie (Zaleska-Wawro i wsp., 2021). Jednak możliwa jest również transmisja pozioma przez krew, kał, mocz i ślinę. AMDV może zanieczyszczać powierzchnie klatek, rękawice, obuwie ochronne, a nawet ślady pozostawione przez opony pojazdów. Skuteczna dezynfekcja ze względu na oporność wirusa na odkażające środki chemiczne oraz warunki środowiskowe jak również architekturę i funkcjonowanie fermy jest niemożliwa do przeprowadzenia. AMDV utrzymuje się w sposób uporczywy na terenie fermy doprowadzając tym samym do reinfekcji zwierząt (Prieto i wsp., 2018). Nawet wyeliminowanie choroby po przeprowadzonej dezynfekcji, nie musi chronić przed reinfekcją z uwagi na trwałość wirusa w warunkach fermowych. Pomimo wprowadzania różnych metod eradykacji choroby, żaden z zastosowanych programów nie osiągnął zadowalających rezultatów (Farid i wsp., 2012; Nituch i wsp., 2011; Prieto i wsp., 2014; Przywara i wsp., 2024).

Naturalnym rezerwuarem wirusa są dzikie norki, szopy sobole, lisy, psy, fretki, koty, króliki oraz myszy. Pierwotne i główne źródło zakażenia stanowią zwierzęta chore oraz bezobjawowi nosiciele wirusa. W warunkach naturalnych choroba aleucka spontanicznie występuje u norek. Według Przywary i wsp. (2024) norki wolno żyjące mogą służyć jako rezerwuariusz wirusa, zagrażając w ten sposób norkom hodowlanym. W wydalinach (kale, moczu) i wydzielinach (ślinie) chorych zwierząt wirus wykrywany jest metodami serologicznymi już 10 dnia po zakażeniu, w mleku natomiast występuje pod koniec laktacji, to jest 36-40 dnia po

porodzie. Ilość i czas oraz drogi wydalania wirusa zależą głównie od jego zjadliwości. Wirusy szczepu wysoko zjadliwego są obecne we wszystkich wydzielinach i wydalinach od 10 dnia po zakażeniu aż do momentu zejścia śmiertelnego. Wtórny źródłem zakażenia są niesterylne narzędzia, strzykawki oraz rękawice używane podczas wykonywania zabiegów lekarskich, a także zanieczyszczona woda i karma oraz sprzęt do pielęgnacji czy poskramiania zwierząt (Gliński i Kostro, 2002; Prieto i wsp., 2017). Przenoszenie wirusa AMDV odbywa się zarówno drogą poziomą, jak i pionową. Zakażenie naturalne poziome szerzy się głównie drogą inhalacyjną, rzadziej pokarmową lub przez kontakt bezpośredni. Podstawową rolę w transmisji wirusa odgrywa droga pionowa (Prieto i wsp., 2017).

W związku z brakiem skutecznego leczenia oraz szczepionki przeciwko chorobie aleuckiej, możliwa jest jedynie eradykacja wirusa poprzez badanie nerek na obecność przeciwciał anty-AMDV za pomocą metod serologicznych, takich jak CIEP (immunoelktroforeza przeciwprądowa) lub test ELISA, a następnie eliminowanie zwierząt seropozytywnych (Farid i wsp., 2015). Jak podają Farid i Hussain (2019), przeciwciała możliwe są do wykrycia już po 6. dniu od zakażenia AMDV. Według tych autorów, podobnie jak w przypadku innych wirusów, wykrywanie infekcji metodami molekularnymi możliwe jest znacznie wcześniej niż serologicznymi. Jak podają Farid i wsp. (2015), przeciwciała były możliwe do wykrycia z wykorzystaniem metody CIEP już od 5. do 7. dnia po inokulacji. Wykrywane metodą PCR materiału genetycznego wirusa AMDV, między 3. a 20. dniem, umożliwia szybszą diagnostykę. Wiremia może być wykrywana za pomocą techniki PCR na wcześniejszym etapie niż przy użyciu metod serologicznych, co potencjalnie ułatwia bardziej skuteczne monitorowanie i kontrolowanie zakażenia. Farid i wsp. (2015) wskazują, że istotną rolę w kinetyce replikacji wirusa i odpowiedzi przeciwciał odgrywają genotyp norki, wariant wirusa i dawka podczas inokulacji.

Po wnikięciu do organizmu wirus AMD intensywnie się replikuje, szczególnie w tkance limfoidalnej, wykazując preferencję do limfocytów T i B. Replikacja wirusa zachodzi także w śledzionie, węzłach chłonnych oraz w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej i szpiku kostnym. U noworodków wirus replikuje się głównie w aktywnie dzielących się komórkach nabłonka pęcherzyków płucnych II stopnia, co prowadzić może do śródmiąższowego zapalenia płuc (Gąsiorek, 2023).

U zakażonych osesków pochodzących od matek seropozytywnych oraz u dorosłych nerek rozwija się przewlekła postać AD, która wynika z utrzymującej się infekcji i prowadzi do upośledzenia układu odpornościowego. Takie zakażone norki stają się trwałymi nosicielami oraz wektorami wirusa. Przeciwciała anty-AMDV wytwarzane przez organizm nerek ulegają

agregacji w naczyniach krwionośnych narządów mięsnych, takich jak nerki, wątroba i śledziona. Tworzą one kompleksy immunologiczne wywołujące miejscowe stany zapalne tych narządów. Trwała aktywacja odpowiedzi humoralnej prowadzi do plazmocytozy - intensywnej proliferacji komórek plazmatycznych produkujących swoiste przeciwciała (Karimi i wsp., 2022, Jepsen i wsp., 2009; Żmuda i wsp., 2022). Plazmocyty gromadzą się w śledzionie, nerkach, wątrobie oraz węzłach chłonnych, powodując zmiany morfologiczne oraz dysfunkcje tych narządów (Markarian i Abrahamyan, 2021; Żmuda i wsp., 2022). Postępujące uszkodzenia w nerkach i wątrobie mogą skutkować mocznicą, będącą bezpośrednią przyczyną zejść śmiertelnych. Nadmiar kompleksów immunologicznych doprowadza do przeciążenia układu siateczkowo-śródbłonkowego i uszkodzenia lizosomów komórek wątroby, nerek i śledziony. Wraz z rozwojem infekcji pierwotnie wywołanej przez wirus dochodzi do zakłócenia tolerancji immunologicznej, co powoduje produkcję autoprzeciwciał skierowanych przeciwko antygenom własnych tkanek. Zmienione białka działają jako autoantygeny stymulujące wytwarzanie kolejnych autoprzeciwciał, które tworzą łącząc się z nimi dodatkowe kompleksy immunologiczne, co pogłębia zmiany chorobowe powstałe pierwotnie w wyniku połączenia się wirusa ze swoistą immunoglobuliną. Ponadto znaczna supresja układu immunologicznego zwiększa podatność zwierząt na wtórne zakażenia bakteryjne, takie jak zakażenia *Pasteurella sp.*, *Salmonella sp.* lub *Streptococcus sp.* (Reichert i Kostro 2014a).

1.6. Reakcja układu immunologicznego norki na zakażenie AMDV

Układ odpornościowy norki amerykańskiej charakteryzuje się złożoną odpowiedzią immunologiczną, która odgrywa kluczową rolę w zwalczaniu infekcji oraz utrzymaniu homeostazy organizmu. Choroba aleucka (AD), wywoływana przez wirusa choroby aleuckiej (AMDV), stanowi model badawczy immunopatologii. Odpowiedź immunologiczna norki wobec AMDV dostarcza cennych informacji o interakcji wirusa z układem odpornościowym.

Odpowiedź humoralna obejmuje wytwarzanie przeciwciał przez komórki plazmatyczne wywodzące się z limfocytów B. Proces ten rozpoczyna się po związaniu antygenów wirusowych z receptorami komórek B (BCR, *B Cell Receptors*), co prowadzi do selekcji klonalnej i różnicowania limfocytów B w komórki plazmatyczne lub komórki pamięci immunologicznej (Chen i Aasted, 1998; Jakubisiak i wsp., 2020).

W przypadku infekcji AMDV przeciwciała, choć wiążą wirusa, nie wykazują właściwości neutralizacyjnych. Mechanizm immunologiczny znany jako wzmocnienie infekcji zależne od przeciwciał (ADEI, *antibody-dependent enhancement of infection*) ułatwia wirusowi

endocytozę do komórki przez receptor Fc (Bloom i wsp., 2001; Markarian i Abrahamyan, 2021; Vahedi i wsp., 2023). Wczesna faza infekcji charakteryzuje się wysoką wiremią niezwiązanego wirusa we krwi (Alexandersen i wsp., 1986; Farid i Hussain, 2020). Ciągła replikacja AMDV prowadzi do narastającej odpowiedzi humoralnej i wytwarzania specyficznych przeciwciał. W miarę postępu choroby pojawiają się także przeciwciała skierowane przeciw antygenom własnego organizmu, co skutkuje rozwojem hypergammaglobulinemii. Specyficzne przeciwciała charakteryzują się wysokim powinowactwem do wirusa (Kowalczyk i Jakubczak, 2015).

Hypergammaglobulinemia u nerek z AD odzwierciedla zaawansowanie choroby. Przeciwciała wirusowo swoiste (specyficzne dla AMDV), jak i autoimmunologiczne (skierowanych przeciwko antygenom własnym), składają się na całkowity wzrost poziomu gammaglobulin, który może być od 3 do 10 razy wyższy niż u zdrowych zwierząt (Trautwein i Müller-Peddinghaus, 1981). Poziom hypergammaglobulinemii jest zależny od wielkości dawki zakaźnej i zjadliwości wirusa (Porter i wsp. 1969). Wraz ze wzrostem poziomu gammaglobulin nasileniu ulegają zmiany patologiczne w tkankach, co ma wpływ na żywotność nerek. Przeciwciała klasy IgA, IgG, IgM norki amerykańskiej wykazują identyczne właściwości co immunoglobuliny innych ssaków (Gąsiorek, 2023).

Odpowiedź komórkowa w chorobie aleuckiej norki opiera się na aktywacji limfocytów Th1 i Th2, cytokinizacji oraz funkcji makrofagów i limfocytów Tc. We wczesnej fazie infekcji wzrasta liczba limfocytów CD8+ we krwi obwodowej, podczas gdy liczba CD4+ pozostaje stabilna. Skutkuje to obniżeniem stosunku CD4+/CD8+ (Jensen i wsp., 2003). Ekspresja cząsteczek MHC klasy II na limfocytach CD8+ oraz makrofagach wzrasta wraz z postępiem infekcji (Chen i Aasted, 1998).

Replikacja AMDV zachodzi w tkance limfatycznej węzłów chłonnych, głównie w makrofagach i komórkach dendrytycznych. W późnym stadium infekcji obserwuje się zmniejszenie liczby limfocytów B oraz zwiększenie komórek plazmatycznych w węzłach chłonnych (Bloom i wsp., 1994). W grasicy dochodzi do inwolucji strukturalnej i przekształceń subpopulacji limfocytów, z dominacją komórek CD8+ (Mori i wsp., 1994).

Układ odpornościowy norki amerykańskiej wykazuje złożoną odpowiedź immunologiczną wobec AMDV, która obejmuje zarówno odpowiedź humoralną, jak i komórkową. Rozwój choroby aleuckiej wiąże się z narastaniem hipergammaglobulinemii, zmianami w subpopulacjach limfocytów oraz depozycją kompleksów immunologicznych, co prowadzi do dysfunkcji narządów mięszowych. Badania nad układem odpornościowym norki dostarczają istotnych informacji o mechanizmach immunopatologii i mogą stanowić model dla

ludzkich chorób autoimmunologicznych (Suzuki i Tomino, 2008).

1.7. Czynniki wpływające na patogenezę

Przebieg choroby aleuckiej zależy od genotypu i wieku zwierzęcia oraz od zjadliwości wirusa (Kowalczyk i wsp., 2019). Klasyczną postacią choroby u dorosłych nerek niezależnie od genotypu oraz dużą śmiertelność osesków od 90 do 100% wywołują szczepy wirusa o wysokiej zjadliwości. Natomiast szczepy o średniej i niskiej zjadliwości wywołują zachorowania od 50 do 70% osesków ich śmiertelność waha się od 30 do 50%. Szczepy te klasyczny przebieg choroby wywołują wyłącznie u dorosłych nerek odmiany aleuckiej (Jakubczak i wsp., 2017; Kowalczyk i wsp. 2019).

Przebieg choroby zależy od genotypu zwierzęcia. Uznaje się, iż najbardziej podatne na zakażenie AMDV są homozygotyczne norki aleuckie, u których występują niedobory immunologiczne związane z większą podatnością na choroby zakaźne, czyli tak zwany syndrom *Chediak-Higashi* (CHS, *Chediak Higashi Syndrome*) (Anistoroaei i wsp., 2013). U nerek z tym defektem odpornościowym objawy klasycznej postaci AD pojawiają się szybciej i są bardziej nasilone. U nerek dorosłych odmiany aleuckiej bez względu na zjadliwość szczepu choroba z reguły kończy się śmiercią. Charakterystyczne dla jej przebiegu są wzrost miana przeciwciał i poziomu gammaglobulin oraz rozwój objawów klinicznych. Norki o innym genotypie pod wpływem szczepów o średniej i niskiej zjadliwości mają niski poziom swoistych przeciwciał oraz bezobjawowy przebieg choroby (Kowalczyk i wsp., 2019). U dorosłych nerek należących do odmian innych niż aleucka, zakażenia szczepami o niskiej zjadliwości są zwykle bezobjawowe (Kowalczyk i wsp., 2019). Anistoroaei i wsp. (2012) określili podłoże genetyczne syndromu *Chediak-Higashi* w oparciu o analizę genu *LYST*. Zidentyfikowali delecję w obrębie 40 eksonu (c.9468delC) jako odpowiedzialną za występowanie CHS. Mutacja powoduje przesunięcie ramki odczytu, które skutkuje przedwczesnym kodonem stop w pozycji 9569, co odpowiada przedwczesnej terminacji syntezy białka w pozycji 3195 (p.Leu3156Phe*37). Identyfikacja tej mutacji w genie *LYST* umożliwiła selekcję genetyczną nerek amerykańskich. Występowanie syndromu CHS u nerek może służyć jako potencjalny model zwierzęcy w mutacjach spowodowanych brakiem sekwencji kodujących białka *LYST* u ludzi (Anistoroaei i wsp., 2012).

Rozwój choroby aleuckiej jest uzależniony również od wieku zwierzęcia. Choroba ta może przebiegać w 2 postaciach: ostrej płucnej i przewlekłej klasycznej. Postać ostra występuje u osesków do 3 tygodnia życia, które nie posiadają jeszcze swoistych przeciwciał dla wirusa

AMDV. Objawia się ona zaburzeniami ze strony układu oddechowego, takimi jak silne duszności będącymi wynikiem rozwoju śródmiąższowego zapalenia płuc (Jensen i wsp., 2015; Reichert i Kostro, 2014a; Wilson i wsp., 2015). Cechuje się ona wysoką śmiertelnością. Postać klasyczną choroby aleuckiej można rozpoznać po zwiększonym pragnieniu nerek przy zachowanym apetycie. Wraz z rozwojem choroby następuje utrata apetytu, spadek masy ciała, odwodnienie, zmatowienie włosa, błądź błon śluzowych i opuszków stóp wynikająca z anemii. Na fermach z klasyczną postacią AD (Kowalczyk i wsp., 2018). AMDV powoduje wysokie miana przeciwciał, plazmacytozę i chorobę kompleksu immunologicznego, z objawami klinicznymi od subklinicznych do śmiertelnych. Objawy obejmują na przykład osłabienie, anemię, objawy neurologiczne, niewydolność nerek i zmniejszoną wielkość miotu u dorosłych oraz zapalenie płuc u osesków. Dodatkowo występują zaburzenia ze strony układu pokarmowego, dysfunkcja nerek i wątroby prowadząca do mocznicy, która to jest zwykle bezpośrednią przyczyną padnięć zwierząt (Jensen i wsp., 2015; Virtanen i wsp., 2021).

1.8. Diagnostyka choroby aleuckiej

Wstępne rozpoznanie choroby aleuckiej możliwe jest na podstawie takich objawów jak pojawienie się na fermie częstych poronień, spadek plenności i płodności wysoka śmiertelność osesków oraz liczne upadki kilkumiesięcznych nerek. Jednak takie rozpoznanie powinno być potwierdzone badaniami laboratoryjnymi. W diagnostyce AD do oznaczenia hipergammaglobulinemii wykorzystywany jest test jodowy (Kowalczyk i Jakubczak, 2015). Z uwagi na niską specyficzność próby jodowej zastąpiona została ona w rutynowej diagnostyce metodami serologicznymi, w tym metodą CIEP (immunoelktroforeza przeciwwądrowa) oraz testem ELISA (Ma i wsp., 2016). Obydwie metody są oparte na reakcji antygen-przeciwciało. Metoda CIEP jest w stanie wykryć przeciwciała już od 5 dni od momentu zakażenia (Knuuttila i wsp., 2014). Ponadto, immunoelektroforeza przeciwwądrowa może dawać wyniki fałszywie dodatnie oraz ujemne (Jensen i wsp., 2011; Farid i wsp., 2012). Niewątpliwą zaletą jest jej niski koszt, co skutkowało zastosowaniem tej metody w wielu laboratoriach. Inną metodą oparta o poszukiwanie reakcji antygen-przeciwciało jest test immunoenzymatyczny ELISA, który pozwala na selekcję nerek w kierunku odporności na chorobę aleucką w oparciu o wysokość mian przeciwciał anti-AMDV. Metoda ta może doprowadzić do uzyskania populacji nerek tolerujących chorobę. Norki o różnych mianach przeciwciał w teście ELISA różnią się wielkościami parametrów biochemicznych, które odpowiadają za wielonarządowe zmiany zapalne oraz ilością kopi AMDV (Gąsiorek, 2023; Knuuttila i wsp., 2014).

U nerek zainfekowanych wirusem o wysokiej zjadliwości, bez względu na ich genotyp, po 2-3 tygodniach od zakażenia następuje znaczny wzrost poziomu gammaglobulin w surowicy, który pozostaje podwyższony przez cały czas trwania choroby. Norki odmiany niealeuckiej zainfekowane wirusem o średniej i małej zjadliwości wykazują niską gammopatię, więc wyniki testu jodłowego są niepewne bądź ujemne. Fałszywie ujemne wyniki tego testu mogą wystąpić u młodych norcząt oraz w początkowym etapie infekcji u dorosłych nerek. Fałszywie dodatnie wyniki mogą być skutkiem niewłaściwego żywienia zwierząt (jako objaw schorzeń wątroby) lub hipergammaglobulinemii poszczepiennej. Z uwagi na możliwość fałszywych wyników test jodłowy jest użyteczny wyłącznie do ogólnej oceny sytuacji epizodycznej a nie określania stopnia zakażenia AMDV nerek na fermach hodowlanych (Farid i wsp., 2015; Jensen i wsp. 2014; Jensen i wsp., 2015).

Metody pośrednie w diagnostyce AD pozwalają wykazać obecność swoistych przeciwciał w surowicy krwi lub antygenów wirusa w zakażonych tkankach i narządach wewnętrznych. Przeciwciała pojawiają się około 10. dnia po zakażeniu. Ich miano, bez względu na zjadliwość wirusa, utrzymuje się u nerek odmiany aleuckiej na względnie stałym poziomie. U nerek należących do niealeuckich odmian wirus o średniej lub niskiej zjadliwości powoduje, iż miano przeciwciał jest niskie lub sukcesywnie maleje (Farid i wsp., 2022).

W rutynowej diagnostyce zakażeń wirusem AMDV wykorzystuje się immunoelektroforezę przeciwpądową. Zaletami tej metody są: wysoka swoistość, bardzo dobra czułość, łatwość pozyskiwania antygeny (supernatant z homogenatów śledziony, wątroby i węzłów kreskowych), krótki czas wykonania testu, niższy koszt względem pozostałych metod a wadami są: możliwość uzyskania wyników fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych. Natomiast wadą obydwu stosowanych w praktyce metod serologicznych jest okienko serologiczne, czyli okres od momentu zakażenia do wykrywalnego metodami diagnostycznymi miana przeciwciał pozwalającego zwalczyć dany antygen.

Ze względu na wyższą czułość i swoistość w porównaniu do metod konwencjonalnych w diagnostyce zakażeń wirusem AMDV coraz częściej stosowane są techniki biologii molekularnej, w tym metoda hybrydyzacji Southernblot i Northernblot oraz hybrydyzacja *in situ* z użyciem sondy. Bardziej skuteczną metodą niż hybrydyzacja jest wykrywanie wirusowego DNA w leukocytach za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy PCR (Kowalczyk i Jakubczak, 2015; Prieto i wsp., Farid, 2013). Obecnie ta metoda może być używana odrębnie w diagnostyce bądź jako etap wstępny dla bardziej precyzyjnych technik. Zasadniczym celem PCR jest namnożenie specyficznego fragmentu DNA, jednak stosując rozdział elektroforetyczny na żelu oraz późniejszą wizualizację możliwe jest także stwierdzenie bądź

wykluczenie obecności materiału genetycznego wirusa. Technika jest z powodzeniem stosowana do wykrywania materiału wirusowego we krwi, tkankach czy wydzielinach zwierząt zakażonych. Charakteryzuje się czułością na poziomie prawie 95% oraz specyficnością bliską 98%. Duża czułość PCR sprawia, że metoda jest także podatna na nawet niewielką kontaminację (Kowalczyk i Jakubczak, 2015). Metoda łańcuchowej polimerazy jest skuteczna również w monitorowaniu przebiegu choroby aleuckiej poprzez cykliczne badanie materiału biologicznego od zakażonych nerek (wymaz z okolic nosa, krew, odchody i ślina) (Jensen i wsp., 2014).

Z uwagi na brak metod przyczynowego leczenia choroby aleuckiej istotne jest zapobieganie chorobie. W postępowaniu przeciwpizootycznym podstawowym elementem jest izolacja, w następnej kolejności usunięcie z fermy chorych zwierząt (pierwotnego źródła zakażenia), a także eradykacja wirusa ze środowiska zewnętrznego środkami dezynfekcyjnymi. Z uwagi na brak swoistej profilaktyki jedyną metodą zapobiegania chorobie AD jest wczesna swoista diagnostyka obejmująca coroczne badania przed kryciem oraz po odsadzeniu. Wczesna detekcja wirusa i usunięcie zainfekowanych zwierząt pozwalają zapobiec zawleczeniu choroby do ferm wolnych od AMDV.

1.9. Charakterystyka genomu norki amerykańskiej

Liczbę chromosomów u norki jako pierwszy podał w swojej pracy Shackelford i Wipf (1947). Następnie informację tą potwierdzili Lande (1957), Humphrey i Spencer (1959). Hameister i wsp. (1997) badając podobieństwo kariotypów w nadrodzinie *Felidae*, wykorzystali 24 sondy specyficzne dla ludzkich chromosomów w celu wizualizacji segmentów konserwatywnych na chromosomach metafazowych norki amerykańskiej. Stwierdzili, że ludzkie chromosomy mają tylko 34 segmenty zbieżne z kariotypem norki., natomiast wykazali, że układ u norek podobny do układu znalezionej u kota, potwierdzając w ten sposób wysoki konserwatywny kariotypu opisany dla *Feloidae*. Pierwsza mikrosatelitarna mapa sprzężeń dla norki amerykańskiej została opisana przez Anistoroaei i wsp. (2007). Według tych autorów składa się ona z 85 markerów mikrosatelitarnych podzielonych na 17 grup sprzężeń. Te grupy sprzężeń zostały przypisane do 12 z 14 autosomów norek. Mapa ta ułatwiła mapowanie genetyczne cech monogenowych i QTL (*Quantitative Trait Loci*). Pierwsze próby opisanie genomu norki były utrudnione przez brak genomu referencyjnego, dopiero Cai i wsp. (2017) zsekwencjonowali wykorzystując technologię Illumina, generując sekwencję o długości 797Gb. Autorzy ci wykazali, że sekwencje powtórzone stanowią około 31% genomu, czyli mniej niż w przypadku genomów psów i kotów oraz zidentyfikowali 21 053 sekwencje genów kodujących białka obecnych w genomie norek, a struktura genomu referencyjnego była zgodna z mapą genetyczną opartą o sekwencje mikrosatelitarne. Cai i wsp. (2017) ograniczyli się jednak w swoich badaniach do identyfikacji i lokalizacji genów oraz loci cech ilościowych QTL, warunkujących cechy związane z jakością futra. Pierwsza wersja robocza genomu norki amerykańskiej została opublikowana przez zespół Cai i wsp. w 2017 roku i miała rozmiar 2,4Gb. Jednak ten projekt był bardzo pofragmentowany i składał się z 7175 rusztowań z N50 wynoszącym 6,3Mb.

Badania Karimi i wsp. (2022) dostarczyły wysokiej jakości genomu na poziomie chromosomów dla norki amerykańskiej, pomimo postępów w badaniach całego genomu norki amerykańskiej dzięki dostępności tego projektu, brak informacji chromosomalnych, a także istniejące scaffolds o krótkiej długości doprowadziły do pewnych ograniczeń w badaniach genomicznych norek. Wstępny projekt złożenia genomu został wygenerowany przy użyciu 2 884 047 długich odczytów. Integracja danych doprowadziła do powstania zespołu ze 183 scaffoldów i scaffoldem o wielkości 220 Mb. Złożenie genomu norki amerykańskiej (ASM_NN_V1) miało długość 2,68 Gb, w którym około 98,6% całego genomu było pokryte przez 15 chromosomów. W sumie 25 377 genów zostało przewidzianych w genomie norki

amerykańskiej przy użyciu NCBI Eukaryotic Genome Annotation Pipeline. W stosunku do wcześniejszych prób uzyskano postęp w postaci ciągłości genomu w porównaniu z pierwszym projektem złożenia genomu norki (NNQGG.v01) (Karimi i wsp., 2022).

Struktury genetyczne nerek hodowlanych i dzikich były analizowane z wykorzystaniem danych pochodzących z różnych markerów molekularnych, w tym markerów mikrosatelitarnych, mitochondrialnego DNA oraz polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP). Loci mikrosatelitarne zostały wykorzystane do analizy struktur genetycznych dziko żyjących nerek amerykańskich w Japonii (Yukari i wsp., 2010; Hu i wsp., 2023), Szwecji (Zalewski i wsp., 2016) i Hiszpanii (Lecis i wsp., 2008). Informacje z mitochondrialnego DNA i 11 loci mikrosatelitarnych wykorzystano do zrozumienia struktury genetycznej norki amerykańskiej wprowadzonej do południowego Chile (Mora i wsp., 2018).

Genotypy uzyskane ze 194 SNP, wygenerowane metodą sekwencjonowania DNA związanego z miejscem restrykcyjnym, wykorzystano do zbadania struktury genetycznej populacji nerek hodowlanych i dziczących nerek amerykańskich w Polsce i Danii (Thirstrup i wsp., 2015). Podobnym problemem zajmowała się Horecka (2015, 2019). Przeprowadziła analizę zróżnicowania genetycznego trzech populacji norki, w tym hodowlanej, dziczącej z Polski oraz dzikiej z terenu Ameryki Północnej. Uzyskane przez nią wyniki dotyczące sekwencji mikrosatelitarnych nie wykazały znaczących różnic w poziomie zróżnicowania genetycznego pomiędzy badanymi populacjami. Stwierdziła jednak istnienie dwóch subpopulacji wywodzących się z odrębnych źródeł genetycznych. W swojej pracy podstawie analizy dwóch genów jądrowych, nie znalazła w przypadku genu *LYST* żadnych różnic pomiędzy populacjami. Natomiast stwierdziła dwie mutacje typu SNP w pierwszym eksonie genu *TYR*. Na podstawie polimorfizmu genów zlokalizowanych w mtDNA (*CYTB*, *COI*, *COII*, *ND4*, *ATP6*) stwierdziła największą zmienność w obrębie populacji dzikiej północnoamerykańskiej, a najniższą w populacji dziczących nerek z Polski.

Karimi i wsp. (2020) wykorzystując sekwencjonowanie GBS do genotypowania nerek amerykańskich z terenu Kanady uzyskał dane zawierające 13 321 SNP obecnych na 46 rusztowaniach od 285 czarno umaszczonej norki. W kolejnej pracy Karimi i wsp., (2021b) badając strukturę genetyczną norki amerykańskiej w Kanadzie za pomocą sekwencjonowania całego genomu (WGS) na 51 rusztowaniach od 100 nerek hodowlanych stwierdził 100 000 SNP.

Dostępność wysokiej jakości genomu jest nie tylko niezbędna do rozwoju badań genomicznych nad norkami amerykańskimi, ale także byłaby cennym zasobem dla genomiki porównawczej i badań ewolucyjnych ssaków mięsożernych. Norki amerykańskie mogłyby być

wykorzystywane jako model zwierzęcy do badania chorób wspólnych dla ludzi i norek, takich jak głuchota, zespołu *Chediak-Higashi*, a także podatności na koronawirusa (Karimi i wsp., 2022).

1.10. Wybrane geny odpowiadające za procesy odpornościowe

Badanie Karimi i wsp. (2021a) dostarczyło pierwszej mapy potencjalnych markerów selekcyjnych odpowiedzi na zakażenie AMDV u norki amerykańskiej, a także nowych informacji na temat regionów genomu kontrolujących fenotypy podatności na chorobę aleucką. Wykryli oni 63 geny powiązane z odpowiedzią immunologiczną, proliferacją komórek wątroby i cechami związanymi z rozrodem. Wykorzystując test hapFLK (test różnicujący populację oparty na haplotypach) w celu wykrycia molekularnych sygnatur selekcji wskazali oni dwa regiony zawierające pięć genów kandydujących związanych z odpowiedzią immunologiczną, interakcją wirus-gospodarz, reprodukcją, regeneracją wątroby, z rozwojem serca i nerek, które mogą być związane z objawami klinicznymi spowodowanymi przez AD w tych tkankach. Wiele z tych genów kandydujących było związanych z reakcją na stres oraz regulacją układu nerwowego, co może wskazywać na istotną rolę odpowiedzi na działanie wirusa podczas rozwoju choroby aleuckiej. Uzyskane przez Karimi i wsp. (2021a) wyniki sugerują, że pięć kluczowych genów, *RNF165*, *LOXHDI*, *SRSF5*, *SLC10A1* i *SKOR2*, było wspólnych dla tych sugestywnych regionów będących kandydatami do selekcji norek tolerujących wirusa AMD i mogą brać udział w krytycznych reakcjach organizmu na zakażenie AMDV. Adnotacja funkcjonalna potwierdziła związek fenotypów AD z regionami genomowymi wykrytymi w tych badaniach. Wykrycie wielu *loci* poddawanych selekcji pod kątem zakażenia AMDV wykazało, że selekcja genomowa może być stosowana jako wykonalne podejście do kontrolowania tej choroby, tj. selekcji zwierząt. Według Karimi i wsp. (2021a) fenotyp przeżycia został uznany za najlepszą miarę ujawniania genomowych sygnatur selekcji w odpowiedzi na zakażenie AMDV. Jednak w programach selekcji genomowej zwierząt w celu zwiększenia tolerancji na AD na fermach norek powinno uwzględniać się miano przeciwciał (ELISA).

Spośród pięciu kluczowych genów, określonych przez Karimi i wsp. (2021a) jako prognostyczne wskaźniki odpowiedzi immunologicznej norek na obecność wirusa AMD (*SRSF5*, *RNF165*, *SKOR2*, *SLC10A1* i *LOXHDI*) do badań własnych wybrano trzy - *SRSF5*, *RNF165* i *SKOR2*. Są to geny zaangażowane w krytyczne reakcje na infekcję AMDV, takie jak odpowiedź immunologiczna, interakcje wirus-gospodarz, procesy reprodukcyjne i regeneracja

wątroby. Geny te odgrywają istotną rolę w odpowiedzi na infekcję wirusem AMDV, w tym w reakcjach immunologicznych, interakcjach między wirusem a gospodarzem, procesach reprodukcyjnych oraz regeneracji wątroby. Białka kodowane przez te geny są zaangażowane m.in. w procesy splicingu RNA oraz rozwój wątroby (gen *SRSF5*), pełnią rolę ligazy ubikwitynowej (gen *RNF165*), co może wpływać na degradację białek wirusowych, a także działają jako korepresory transkrypcyjne, regulujące szlaki sygnałowe związane z układem odpornościowym (gen *SKOR2*). Według Breiga i Baklouti (2013) gen *SRSF5* bierze również udział w różnicowaniu erytrocytów, a u nerek zakażonych wirusem AMDV, jak podają Kowalczyk i wsp. (2018), obserwuje się anemię. Ponadto zgodnie z badaniami Liu i wsp. (2016) gen *SKOR2* związany jest z niepłodnością samic myszy, co można powiązać z faktem, iż według Kowalczyka i wsp. (2018) podczas infekcji AMDV na fermach nerek obserwuje się obniżoną plenność zwierząt i częste ronienia.

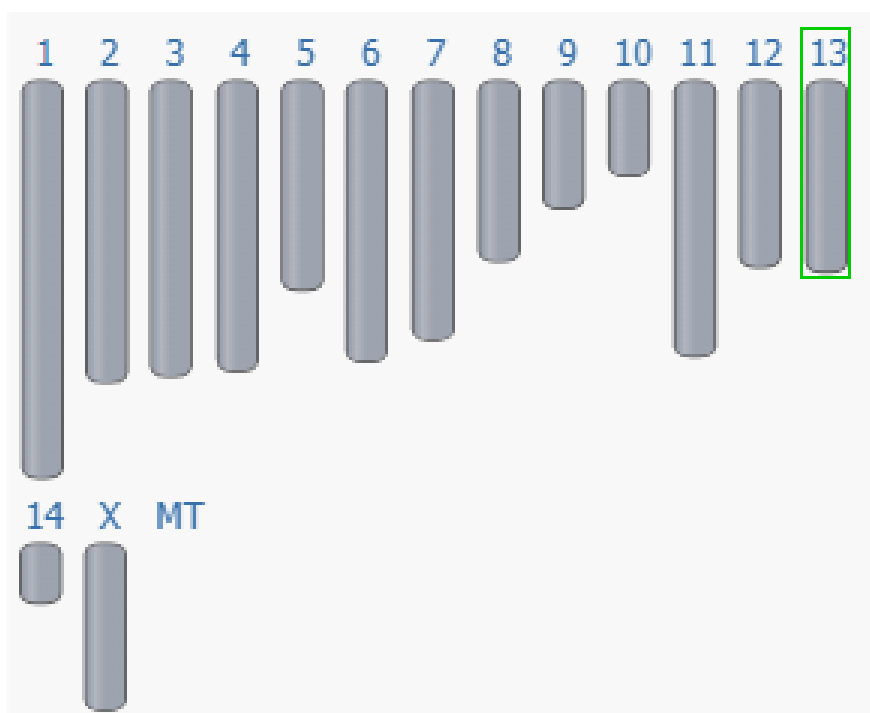
1.10.1. Gen *SRSF5*

Gen *SRSF5* (*Serine/Arginine-rich splicing factor 5*) koduje białko należące do rodziny SR, które regulując alternatywne łączenie eksonów i intronów, pełnią kluczową rolę w splicingu RNA. Jako czynnik transkrypcyjny wpływa ono na procesy takie jak cykl komórkowy i odpowiedź na stres komórkowy. W przypadku *Neogale vison*, *SRSF5* ma istotne znaczenie w regulacji ekspresji genów, w tym mechanizmach mających na celu rozwój i adaptację organizmu (Ensembl, 2024a). Gen *SRSF5* jest jednym z kluczowych czynników zaangażowanych w proces splicingu RNA, który umożliwia modyfikację mRNA po transkrypcji. W organizmach takich jak *Neogale vison* (norka amerykańska), produkt genu *SRSF5* pełni istotną rolę w regulacji alternatywnego splicingu, co ma wpływ na różne procesy komórkowe, w tym odpowiedź na stres i rozwój tkanek (Ensembl, 2024b).

Gen *SRSF5* odpowiada za rozwój wątroby oraz ma związek z klinicznymi objawami wywoływanymi przez AD w tkankach tego narządu. Produkt genu *SRSF5* został zidentyfikowany jako białko indukowane insuliną podczas procesu regeneracji wątroby. (Karimi i wsp., 2021a). *SRSF5* koduje białko należące do rodziny SR, czyli białek bogatych w serynę i argininę. Pełni ono funkcję kluczowego czynnika splicingowego pre-mRNA (Breig i Baklouti, 2013). *SRSF5* jest znany jako główny regulator splicingu mRNA ludzkiego wirusa niedoboru odporności typu 1 (HIV-1) (Caputi i wsp., 2004) oraz promuje translację niesplicingowego RNA wirusa (Swanson i wsp., 2010).

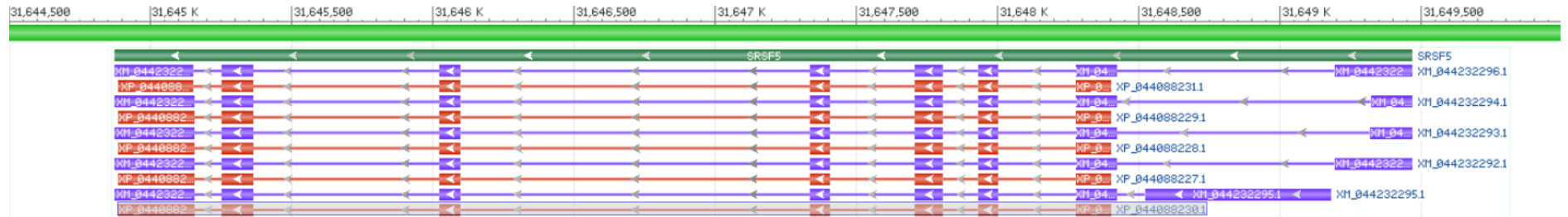
Gen *SRSF5* u norki amerykańskiej (*Neogale vison*) znajduje się na chromosomie 13., w

regionie obejmującym odcinek od 31,644,412 do 31,649,928 par zasad (Genome Data Viewer, 2024a). Rycina 1. przedstawia ideogram kariotypu norki amerykańskiej, z zaznaczeniem zieloną ramką chromosomu 13, na którym zlokalizowany jest gen *SRSF5*. Ideogram obrazuje układ i rozmiary chromosomów w zestawie haploidalnym, w tym chromosomy autosomalne (od 1 do 14), allosom (chromosom X) oraz MT, czyli mitochondrialny DNA (mtDNA).

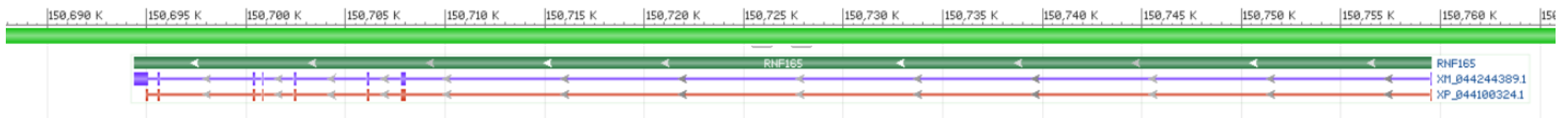


Ryc. 1. Ideogram kariotypu norki amerykańskiej (*Neogale vison*) z zaznaczeniem chromosomu 13, na którym znajduje się gen *SRSF5*

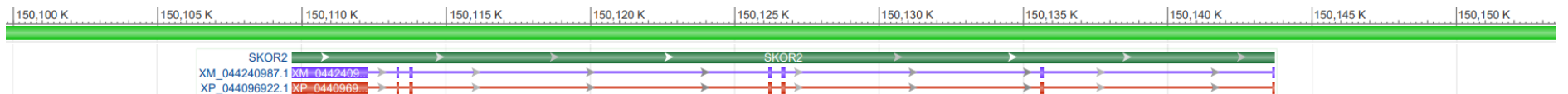
Na rycinie 2. przedstawiono uzyskany w aplikacji Genome Data Viewer układ transkryptów genu *SRSF5* u norki amerykańskiej (*Neogale vison*), zlokalizowanych na chromosomie 13 w regionie od 31644412 do 31649928 par zasad. Zielony pasek u góry obrazuje całkowity zakres genu *SRSF5* na chromosomie, natomiast kolorowe strzałki reprezentują poszczególne warianty transkryptów (oznaczone jako XP_9440822.x), wskazując na istnienie alternatywnego splicingu. Obserwowane różnice w długości i liczbie eksonów między transkryptami mogą sugerować potencjalne zróżnicowanie funkcjonalne wariantów mRNA, co może prowadzić do powstawania różnych izoform białkowych. Informacje przedstawione na platformie Genome Data Viewer sugerują, że gen *SRSF5* może pełnić zróżnicowane funkcje w zależności od rodzaju powstałego transkryptu, co może być istotne dla badań nad jego rolą w procesach biologicznych.



Ryc. 2. Układ transkryptów genu *SRSF5* na chromosomie 13 u norki amerykańskiej (*Neogale vison*) (Genome Data Viewer, 2024a). Zielony pasek u góry - całkowity zakres genu *SRSF5* na chromosomie, strzałki reprezentują poszczególne warianty transkryptów (oznaczone jako XP_9440822.x).



Ryc. 3. Układ transkryptów genu *RNF165* na chromosomie 3 u norki amerykańskiej (*Neogale vison*) (Genome Data Viewer, 2024b). *RNF165* (zielony pasek) oznacza główny transkrypt kodujący białko, XM_044244389.1 (fioletowy pasek) - alternatywny transkrypt, XP_944100324.1 czerwony pasek - kolejny alternatywny transkrypt.

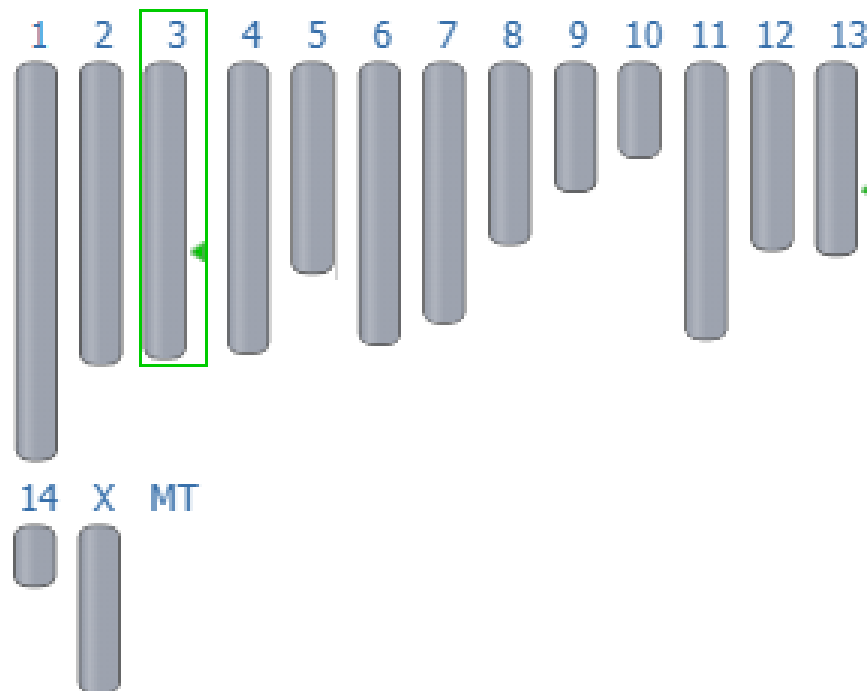


Ryc. 4. Układ transkryptów genu *SKOR2* na chromosomie 3 u norki amerykańskiej (*Neogale vison*). (Genome Data Viewer, 2024c). *SKOR2* (zielony pasek) oznacza główny transkrypt kodujący białko, XM_044240987.1 (fioletowy pasek) - alternatywny transkrypt, XP_044096922.1 (czerwony pasek) - kolejny alternatywny transkrypt.

1.10.2. Gen *RNF165* (*ARK2C*)

Gen *RNF165* (*RING Finger Protein 165*), występujący także pod nazwą *ARK2C*, poprzez swoją aktywność jako ligaza ubikwitynowa, może wpływać na degradację białek wirusowych (Karimi i wsp., 2021a). Gen *RNF165* wraz z genem *SKOR2*, oprócz udziału w odpowiedzi immunologicznej, pełnią funkcje związane z reakcją na bodźce. Gen *RNF165* bierze udział w epigenetycznym programowaniu fenotypów komórek T (limfocytów T) na wczesnych etapach rozwoju człowieka (Martino i wsp., 2012).

Na podstawie analizy danych genomowych oraz wizualizacji przeprowadzonej za pomocą narzędzia Genome Data Viewer ustalono, że gen *RNF165* zlokalizowany jest na chromosomie 3. w genomie norki amerykańskiej (*Neogale vison*). Zgodnie z załączonym na rycinie 5. ideogramem kariotypu norki pozycja genu *RNF165* została jednoznacznie zlokalizowana na chromosomie 3.



Ryc. 5. Ideogram kariotypu norki amerykańskiej (*Neogale vison*) z zaznaczeniem zieloną ramką chromosomu 3, na którym zlokalizowany jest gen *RNF165*.

Gen *RNF165* jest zlokalizowany w regionie chromosomu obejmującym pozycje od 150694340 do 150759578 par zasad (bp). Na rycinie 3. zaprezentowano trzy transkrypty związane z genem *RNF165*:

- *RNF165* (zielony pasek) oznacza główny transkrypt kodujący białko.
- XM_044244389.1 (fioletowy pasek) - alternatywny transkrypt, który może wskazywać

na różne formy splicingu mRNA.

- XP_9441003241 (czerwony pasek) - kolejny alternatywny transkrypt, który sugeruje istnienie różnorodności w ekspresji tego genu.

Każdy z transkryptów jest przedstawiony jako liniowy segment z oznaczonymi kierunkami transkrypcji (strzałki). Położenie i długość poszczególnych transkryptów wskazują na złożoną strukturę genu, która obejmuje wiele egzonów i intronów. Na rycinie 3. widoczne są również regiony niekodujące oraz obszary, które mogą odpowiadać różnym wariantom transkryptów. Obecność różnych transkryptów sugeruje, iż gen *RNF165* może ulegać alternatywnemu splicingowi, co pozwala na wytworzenie różnych izoform białka w zależności od potrzeb komórki. Taka różnorodność w ekspresji genów może być związana z różnymi funkcjami białka w różnych typach komórek lub w różnych warunkach środowiskowych. Dokładne zrozumienie struktury i lokalizacji genu *RNF165* na chromosomie 3. jest kluczowe dla badań nad jego funkcją i regulacją.

1.10.3. Gen *SKOR2*

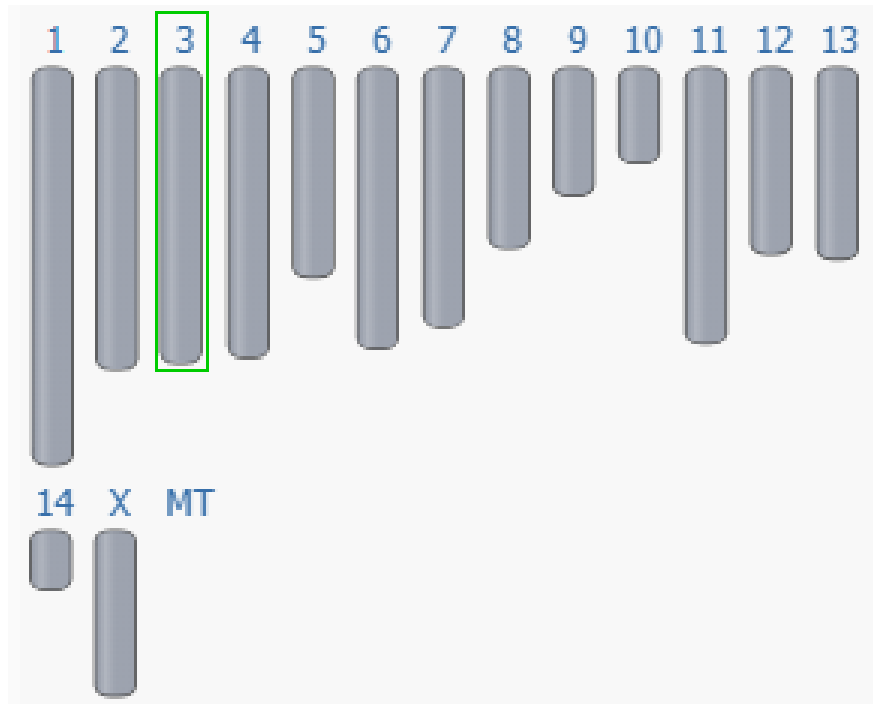
Gen *SKOR2* koduje białko należące do rodziny białek SKI, które są znane jako jeden z głównych negatywnych regulatorów szlaku sygnałowego transformującego czynnik wzrostu- β (TGF- β , *transforming growth factor* β). Wykazano, że utrata sygnalizacji TGF- β była powiązana ze stanami zapalnymi i chorobami autoimmunologicznymi (Karimi i wsp., 2021a), co jest zgodne z naturą choroby aleuckiej jako zaburzenia układu odpornościowego wywołanym przez wirusy. Gen *SKOR2* bierze udział w odpowiedzi immunologicznej oraz reakcji na bodźce (Martino i wsp., 2012). Ponadto, zgodnie z badaniami Liu i wsp. (2016) gen *SKOR2* był związany z niepłodnością samic myszy z hodowli wsobnych (Liu i wsp., 2016).

Gen *SKOR2* u norki amerykańskiej (*Neogale vison*) został zlokalizowany na chromosomie 3, co przedstawiono na rycinie 6. Zajmuje on *locus* w zakresie od 150109668 do 150143701 bp (Genome Data Viewer, 2024c), co precyzyjnie określa jego położenie w genomie tego gatunku. Na rycinie 4. zaprezentowano trzy transkrypty związane z badanym genem:

- *SKOR2* (zielony pasek) oznacza główny transkrypt kodujący białko,
- XM_044240987.1 (fioletowy pasek) - alternatywny transkrypt, który może wskazywać na różne formy splicingu mRNA (pochodzącego z anotowanego transkryptu przewidywanego na podstawie analizy sekwencji genomowych. Transkrypt nie został potwierdzony eksperymentalnie, lecz przewidziany na podstawie algorytmów

bioinformatycznych).

- XP_044096922.1 (czerwony pasek) - kolejny alternatywny transkrypt, który sugeruje istnienie różnorodności w ekspresji tego genu (przewidywana sekwencja białka kodowana przez transkrypt).



Ryc. 6. Ideogram karyotypu norki amerykańskiej (*Neogale vison*) z zaznaczeniem chromosomu 3, na którym znajduje się gen *SKOR2*

2. Cel i hipotezy badawcze

Znalezienie źródeł zmienności genetycznej w obrębie genów mających wpływ na rozwój odpowiedzi immunologicznej oraz zbadanie relacji filogenetycznych pomiędzy osobnikami na podstawie uzyskanych fragmentów genów a wariantami dostępnymi w bioinformatycznych bazach danych było celem niniejszej dysertacji. Podjęto też próbę odpowiedzi na pytanie, czy istnieje możliwość prowadzenia selekcji w kierunku uzyskania zwierząt odpornych. Jest to problem tym bardziej istotny, gdyż wirusy infekujące norki, w tym AMDV, cechują się wysoką częstotliwością mutacji oraz dużymi zdolnościami rekombinacyjnymi, co jest przyczyną szybkiej adaptacji do nowych warunków a obecność genów odporności dawałaby możliwość prowadzenia skutecznego typowania zwierząt nadających się do dalszej hodowli, a co za tym idzie zwalczania i zaawansowanej profilaktyki chorób zakaźnych.

Karimi i wsp. (2021a) zidentyfikowali geny, które mogą pełnić rolę prognostycznych wskaźników odpowiedzi immunologicznej nerek na obecność wirusa AMD. Spośród pięciu kluczowych genów (*SRSF5*, *RNF165*, *SKOR2*, *SLC10A1* i *LOXHD1*) wytypowanych przez Karimiego i wsp. (2021a) jako geny zaangażowane w krytyczne reakcje na infekcję AMDV, takie jak odpowiedź immunologiczna, interakcje wirus-gospodarz, procesy reprodukcyjne i regeneracja wątroby, wytypowano trzy do badań: *SRSF5*, *RNF165* i *SKOR2*. Białka kodowane przez badane geny są odpowiedzialne między innymi za uczestnictwo w procesach splicingu RNA oraz rozwoju wątroby (gen *SRSF5*), pełnienie funkcji ligazy ubikwitynowej, co może wpływać na degradację białek wirusowych (gen *RNF165*), a także spełnianie roli korepresora transkrypcyjnego, regulującego szlaki sygnałowe odpowiedzialne za układ odpornościowy (gen *SKOR2*). Według Breig i Baklouti (2013) gen *SRSF5* bierze udział także w różnicowaniu erytrocytów a podczas infekcji AMDV obserwowana jest anemia u nerek. Ponadto zgodnie z badaniami Liu i wsp. (2016) gen *SKOR2* związany jest z niepłodnością samic myszy, co można powiązać z faktem, iż według Kowalczyka i wsp. (2018) podczas infekcji AMDV na fermach nerek obserwuje się obniżoną plenność zwierząt i częste ronienia.

Analiza polimorfizmu genów *SRSF5*, *RNF165* i *SKOR2* pozwoli na ocenę odpowiedzi immunologicznej nerek. Do badań wybrano materiał biologiczny pochodzący od nerek wykazujących objawy choroby aleuckiej, ponieważ mimo znacznego wpływu tej choroby na zdrowie i dobrostan nerek, nadal nie opracowano skutecznej strategii profilaktycznej. Brak efektywnej szczepionki przeciwko zakażeniom wywoływanym przez wirusa choroby aleuckiej (*Aleutian Mink Disease Virus*, AMDV), wskazuje na pilną potrzebę opracowania nowych

strategii zapobiegania i kontroli tej choroby. Szczególne znaczenie w tym kontekście ma identyfikacja genetycznych markerów związanych z odpornością, które mogą stanowić podstawę dla precyzyjnych metod selekcji hodowlanej.

Materiał genetyczny pochodził od zwierząt należących do dwóch grup: pierwszą stanowiły zwierzęta hodowlane, u których zaobserwowano typowe objawy choroby aleuckiej tj. powiększenie śledziony, gammablobulinemia, czarny smolisty kał, średnią liczbę kopii wirusa na poziomie $1,78E+08$, drugą zwierzęta dziko żyjące bez terminalnych objawów choroby aleuckiej o średniej liczbie kopii wirusa o pięć rzędów mniejszej, czyli $5,43E+03$. Zjadliwość w hodowli fermowej powodowała śmiertelność rzędu 1% młodych zwierząt dziennie. Pomimo stwierdzenia obecności wirusa wśród odłowionych do badań zwierząt dzikich populacja wydaje się stabilna, czyli istnieje mechanizm dostosowujący zwierzęta do panujących warunków środowiskowych. Z poziomem pewnej odporności na wirusa włącznie.

W związku z powyższym, celem pracy była charakterystyka molekularna badanych nerek (pochodzących z grupy hodowlanych i dziko żyjących) oraz analiza korelacji pomiędzy obecnością polimorfizmów molekularnych w obrębie genów *SRSF5*, *RNF165* i *SKOR2* nerek amerykańskich (*Neogale vison*) a poziomem ich odporności wobec choroby aleuckiej nerek.

Hipotezą nadrzędną było założenie, że wśród badanych zwierząt znajdują się osobniki, u których występują polimorfizmy molekularne, które predysponują je do odporności na choroby wirusowe. W celu weryfikacji tej hipotezy podjęte będą następujące działania:

- zsekwencjonowanie wybranych genów potencjalnie odpowiadających za odporność w kierunku chorób wirusowych, co pozwoli na określenie polimorfizmu,
- określenie relacji filogenetycznych w porównaniu z wariantami dostępnymi w bioinformatycznych bazach danych.

W pracy podjęto weryfikację następujących hipotez badawczych:

- Polimorfizmy sekwencji DNA występują zarówno u nerek hodowlanych, jak i dziko żyjących.
- Populacje nerek hodowlanych i dziko żyjących różnią się pod względem stopnia polimorfizmu genetycznego.
- Występuje zróżnicowanie nukleotydowe w obrębie wybranych eksonów trzech badanych genów (*SRSF5*, *RNF165*, *SKOR2*) pomiędzy poszczególnymi osobnikami.
- Istnieje zróżnicowanie wyników pomiędzy sekwencjonowaniem wysokoprzepustowym (NGS) a sekwencjonowaniem metodą Sangera w zakresie analizowanych genów.

- Występujące polimorfizmy genetyczne wpływają na efekt funkcjonalny kodowanych białek, prowadząc do potencjalnych zmian w ich strukturze lub funkcji.
- Mutacje zidentyfikowane w genach *SKOR2*, *SRSF5* oraz *RNF165* mogą być związane z podwyższoną odpornością lub zwiększoną podatnością nerek na zakażenie wirusem choroby aleuckiej nerek (AMDV).

W celu weryfikacji postawionych hipotez sformułowano szczegółowe cele badawcze:

- zaprojektowanie starterów flankujących geny *SRSF5*, *RNF165* oraz *SCOR2*,
- optymalizacja metody PCR pozwalającej na detekcję genów odporności u nerek wytypowanych do badań,
- przygotowanie charakterystyki molekularnej genów *SRSF5*, *RNF165* oraz *SCOR2* u nerek hodowlanych i dzikich,
- identyfikacja miejsc polimorficznych różnicujących norki od innych gatunków należących do rodziny łasicowatych
- identyfikacja miejsc polimorficznych różnicujących badane norki od sekwencji referencyjnych genów *SRSF5*, *RNF165* oraz *SCOR2*
- określenie relacji filogenetycznych pomiędzy osobnikami należącymi do grupy nerek hodowlanych i dziko żyjących na podstawie sekwencji
- określenie wpływu poszczególnych substytucji na efekt funkcjonalny białek kodowanych przez geny *SRSF5*, *RNF165* oraz *SKOR2*.

3. Materiał i metody

Wszystkie badania były prowadzone za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach przy Uniwersytecie Przyrodniczym w Lublinie (numer uchwały – 83/2009 oraz 55/2021).

3.1. Materiał biologiczny

Zwierzęta wykorzystane do badań pochodziły z dwóch grup doświadczalnych. Pierwszą stanowiły padłe norki z fermy zlokalizowanej się na terenie Łotwy, zaś drugą dziko żyjące odłowione na terytorium Polski.

W pierwszej grupie doświadczalnej materiałem biologicznym były fragmenty tkanki śledziony, pobrane *post mortem* od 50 osobników pochodzących z fermy, która została wybrana na podstawie określonych kryteriów. Wytępowana ferma charakteryzowała się wysoką śmiertelnością osobników dorosłych, niską średnią liczbą urodzeń oraz zwiększoną śmiertelnością podczas okresu odchowu. Całkowita obsada fermy stanowiła 80 000 samic stada podstawowego. Ponadto obserwowano dość wysoki odsetek samic, które nie zostały pokryte, zostały prawidłowo pokryte, lecz nie wykocły się, jak również samic roniących. Występowała również wysoka śmiertelność noworodków oraz niska średnia liczba odchowanych szceniąt.

W doborze zwierząt hodowlanych do badań uwzględniono wyłącznie norki, u których metodą serologiczną, przy użyciu immunoelektroforezy przeciwpądowej (CIEP), wykryto obecność swoistych przeciwciał przeciwko wirusowi AMDV. Tkanki padłych zwierząt, w wieku od 35 do 50 dni, zostały dostarczone do laboratorium, gdzie pobrano wycinki śledziony w celu dalszego potwierdzenia obecności infekcji wirusem AMDV. Materiał biologiczny pochodził od 20 samic i 30 samców, reprezentujących trzy odmiany barwne: Brown, Silver oraz Pearl (Tab.1). Pobrane fragmenty śledziony wykorzystano do izolacji DNA zarówno zwierząt jak i występującego u nich patogenu w postaci wirusa AMDV, z zastosowaniem zestawu QIAMP DNA Mini Kit (Qiagen, Niemcy). Dodatkowo, obecność genomowego DNA wirusa AMDV w tkankach badanych nerek potwierdzono metodą PCR (*Polymerase Chain Reaction*) wykorzystując startery specyficzne dla regionów w genomie wirusa kodujących białko niestrukturalne NS1 (*Non-structural protein 1*) oraz białko kapsydu VP2 (*Viral protein 2*).

Tabela 1. Charakterystyka nerek hodowlanych uwzględniająca wiek, odmianę barwną oraz płeć badanych osobników.

| Lp. | Wiek [dni] | Odmiana barwna | Płeć | Lp. | Wiek [dni] | Odmiana barwna | Płeć |
|-----|------------|----------------|------|-----|------------|----------------|------|
| 1 | 36 | Brown | ♂ | 26 | 35 | Brown | ♀ |
| 2 | 38 | Silver | ♀ | 27 | 41 | Brown | ♀ |
| 3 | 39 | Brown | ♂ | 28 | 47 | Pearl | ♂ |
| 4 | 37 | Silver | ♀ | 29 | 44 | Brown | ♂ |
| 5 | 40 | Silver | ♂ | 30 | 41 | Pearl | ♀ |
| 6 | 47 | Silver | ♂ | 31 | 38 | Brown | ♂ |
| 7 | 42 | Brown | ♂ | 32 | 35 | Pearl | ♂ |
| 8 | 44 | Brown | ♀ | 33 | 39 | Brown | ♂ |
| 9 | 40 | Brown | ♂ | 34 | 34 | Brown | ♂ |
| 10 | 46 | Brown | ♂ | 35 | 42 | Brown | ♂ |
| 11 | 41 | Pearl | ♂ | 36 | 43 | Brown | ♀ |
| 12 | 47 | Brown | ♂ | 37 | 40 | Brown | ♂ |
| 13 | 40 | Brown | ♀ | 38 | 35 | Brown | ♂ |
| 14 | 42 | Pearl | ♂ | 39 | 45 | Brown | ♀ |
| 15 | 43 | Brown | ♂ | 40 | 43 | Brown | ♂ |
| 16 | 46 | Brown | ♀ | 41 | 42 | Brown | ♂ |
| 17 | 44 | Brown | ♀ | 42 | 41 | Brown | ♂ |
| 18 | 41 | Brown | ♂ | 43 | 44 | Brown | ♀ |
| 19 | 45 | Brown | ♂ | 44 | 44 | Brown | ♂ |
| 20 | 50 | Brown | ♀ | 45 | 41 | Brown | ♀ |
| 21 | 42 | Brown | ♂ | 46 | 40 | Brown | ♂ |
| 22 | 39 | Brown | ♀ | 47 | 45 | Brown | ♂ |
| 23 | 34 | Brown | ♀ | 48 | 43 | Brown | ♀ |
| 24 | 45 | Brown | ♂ | 49 | 37 | Brown | ♀ |
| 25 | 40 | Brown | ♀ | 50 | 46 | Brown | ♀ |

Drugą grupę badawczą stanowiły dzikie norki, w liczbie 20 osobników (w tym 6 samic i 14 samców), odłowione na terenie Biebrzańskiego Parku Narodowego w latach 2018 – 2019 (Tabela 2.). Wszystkie zwierzęta pochodziły z terytorium Polski i cechowały się jednolitą, brązową barwą okrywy włosowej, charakterystyczną dla fenotypu odmiany standard w typie „scanbrown”. Materiałem biologicznym pobranym do badań od nerek dzikich były również tkanki miękkie w postaci śledziony. Wybór tego narządu wynikał z faktu, że tylko taki rodzaj tkanki był odpowiedni do identyfikacji obecności wirusa AMD. W kontekście diagnostyki wirusa AMDV, najlepiej nadającym się materiałem są próbki krwi pobrane przyżyciowo oraz węzły chłonne przygardłowe i śledziona, które można pozyskać wyłącznie *post mortem*. Z powodu ograniczeń związanych z odłowem dzikich osobników, nie było możliwości pobrania krwi obwodowej, co wykluczyło wykonanie badań serologicznych przy użyciu testu CIEP. W związku z tym do analizy wykorzystano tkankę śledziony. Obecność wirusa AMDV została

potwierdzona metodą PCR, z zastosowaniem starterów dla białek NS1 i VP2.

Tabela 2. Charakterystyka dzikich norek odłowionych w Biebrzańskim Parku Narodowym w latach 2018-2019, z uwzględnieniem koloru umaszczenia, płci, masy ciała oraz długości ciała.

| Lp. | Rok odłowu | Kolor | Płeć | Masa ciała [g] | Długość ciała [cm] |
|-----|------------|-------|------|----------------|--------------------|
| 1 | 2019 | Brown | ♀ | 619 | 34,0 |
| 2 | 2019 | Brown | ♂ | 993 | 40,5 |
| 3 | 2019 | Brown | ♂ | 816 | 39,0 |
| 4 | 2019 | Brown | ♂ | 1191 | 42,0 |
| 5 | 2019 | Brown | ♂ | 1141 | 40,0 |
| 6 | 2019 | Brown | ♂ | 636 | 37,0 |
| 7 | 2019 | Brown | ♂ | 832 | 38,0 |
| 8 | 2019 | Brown | ♂ | 937 | 43,0 |
| 9 | 2018 | Brown | ♀ | 813 | 37,0 |
| 10 | 2018 | Brown | ♀ | 993 | 41,0 |
| 11 | 2018 | Brown | ♀ | 595 | 33,0 |
| 12 | 2018 | Brown | ♂ | 1222 | 41,0 |
| 13 | 2018 | Brown | ♂ | 910 | 39,5 |
| 14 | 2018 | Brown | ♂ | 930 | 38,0 |
| 15 | 2018 | Brown | ♂ | 800 | 39,0 |
| 16 | 2018 | Brown | ♀ | 746 | 33,0 |
| 17 | 2018 | Brown | ♀ | 621 | 33,0 |
| 18 | 2018 | Brown | ♂ | 972 | 41,0 |
| 19 | 2018 | Brown | ♂ | 945 | 38,5 |
| 20 | 2018 | Brown | ♂ | 1383 | 40,5 |

3.2. Diagnostyka serologiczna AMDV za pomocą testu CIEP

W badanym stadzie hodowlanym aleucka norek jest rutynowo diagnozowana metodami serologicznymi. Materiał biologiczny do takiej diagnostyki stanowią próbki krwi pobierane przyżyciowo od norek z fermy z widocznymi objawami AMD. Pobieranie krwi odbywa się do kapilar z naciętego pazura, po uprzednim miejscowym znieczuleniu za pomocą 2% lignokainy. Badanie serologiczne przeprowadzono na fermie u osobników dorosłych przy użyciu testu CIEP, który jest rutynowo stosowany w diagnostyce choroby aleuckiej norek. Jednak z uwagi na fakt, iż zwierzęta, które zostały dostarczone do badań laboratoryjnych były martwe (padły w wieku od 34 do 50 dni), nie było możliwości pobrania krwi do badań serologicznych i przeprowadzenia na tych konkretnych osobnikach. Dlatego też obecność wirusa potwierdzono z wykorzystaniem komercyjnego testu qPCR.

3.3. Analizy molekularne

Materiał biologiczny do badań genetycznych zarówno nerek hodowlanych, jak i dziko żyjących stanowiły próbki śledziony pobrane *post mortem* dostarczone do badań w celu stwierdzenia obecności wirusa.

3.3.1. Izolacja materiału genetycznego

Izolację z tkanek przeprowadzono przy użyciu komercyjnego zestawu DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN, Niemcy).

Etapy izolacji:

1. Rozdrobnione 10mg tkanki przeniesiono do 1,5ml probówek typu Eppendorf, następnie dodano 180µl buforu ATL.
2. Dodano 20µl proteiny K. Próbkę worteksowano i następnie inkubowano w 56°C do momentu kompletnej lizy tkanki. Podczas inkubacji próbki od czasu do czasu worteksowano, aby rozrzedzić tkankę.
3. Próbkę worteksowano przez 15s, dodano 200µl buforu AL i ponownie worteksowano. Następnie dodano 200µl etanolu i wymieszano przez worteksowanie.
4. Przeniesiono za pomocą pipety automatycznej zawartość probówki z punktu trzeciego na kolumnę DNeasy Mini spin umieszczoną w probówce typu Eppendorf o pojemności 2ml. Próbkę zwirowano z prędkością 8000rpm przez 1 minutę.
5. Przeniesiono kolumnę DNeasy Mini spin do nowych probówek o pojemności 2ml, dodano 500µl buforu AW1 i wirowano próbki z prędkością 8000rpm przez 1 minutę.
6. Przeniesiono każdą kolumnę DNeasy Mini spin do nowych probówek o pojemności 2ml, dodano 500µl buforu AW2 i wirowano przez 3 minuty z prędkością 14 000rpm, aby wysuszyć membranę kolumny.
7. Kolumnę DNeasy Mini spin przeniesiono do czystych probówek o pojemności 1,5ml i dodano za pomocą pipety automatycznej wprost na membranę kolumny 200µl buforu AE. Inkubowano próbki przez 1 minutę w temperaturze pokojowej a następnie zwirowano z prędkością 8000rpm przez 1 minutę.
8. W celu zwiększenia wydajności elucji powtórzono czynności z punktu siódmego.

3.3.2. Ocena elektroforetyczna wyizolowanego materiału genetycznego

W celu oceny jakości uzyskanego DNA wykonano elektroforezę w 1% żelu agarozowym z użyciem buforu 1x TBE stosując stałe napięcie prądu elektrycznego 80V przez 1 godzinę. Wizualizację prób wykonano przy użyciu bromku etydyny (EtBr), który umożliwia interkalację DNA, a obserwacji dokonano w świetle UV. Do archiwizacji obrazu żelu wykorzystano program ScionImage.

3.3.3. Potwierdzenie obecności wirusa AMDV metodą PCR, z zastosowaniem starterów dla białek NS1 i VP2 wraz z oceną elektroforetyczną

Diagnostykę molekularną AMDV wykonano z użyciem techniki łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) z zastosowaniem starterów dla fragmentów genów kodujących białka VP2 oraz NS1 genomu wirusa AMDV.

Primery użyte do reakcji PCR (Tabela 3) w celu amplifikacji genu kodującego białko VP2 zostały zapożyczone z pracy Costello i wsp. (1999), natomiast startery do amplifikacji genu kodującego białko NS1 pochodzą z pracy Canuti i wsp. (2016). Zarówno norki hodowlane, jak i dzikie, poddano szczegółowej diagnostyce metodą PCR, wykorzystując trzy pary starterów. Dwie z tych par amplifikowały dwa odrębne fragmenty genu kodującego białko VP2, określone jako RP2 i RP3, natomiast trzecia para służyła do amplifikacji fragmentu genu kodującego białko NS1. Reakcje te zostały zoptymalizowane w trakcie badań wstępnych. Do przeprowadzenia reakcji PCR zastosowano zestaw AmpliTaq Gold 360 DNA Polymerase (Applied Biosystems) w termocyklerze Labcycler (SensoQuest, Getynga, Niemcy). W każdej reakcji PCR wykorzystano 3 µl matrycowego DNA oraz 1U polimerazy Taq AmpliTaq Gold 360 DNA Polymerase (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Incorporated, USA), w buforze dostarczonym przez producenta. Reakcje PCR przeprowadzono w warunkach, gdzie końcowe stężenie MgCl₂ wynosiło 2,5 mM, stężenie każdego dNTP 0,8 mM, a każdego startera 1,2 mM, przy całkowitej objętości próby reakcyjnej wynoszącej 25 µl.

Tabela 3. Sekwencje starterów użytych w reakcjach PCR do amplifikacji fragmentów genów kodujących białka VP2 i NS1, wraz z długością produktów PCR [pz], temperaturami przyłączania starterów Tm [°C] i odniesieniem do badań, w których po raz pierwszy zastosowano startery.

| Nazwa startera | F/R | Sekwencja | Długość produktu [pz] | Tm [°C] | Referencja |
|------------------------------|-----|----------------------------|-----------------------|---------|-----------------------|
| RP2 (fragment białka VP2) | F | TCTAGAAGCAACGCTTGGGGTGTATG | 802 | 58 | Costello i wsp., 1999 |
| | R | GTTGTGTCACCTCCACTGTCT | | | |
| RP3 (fragment białka VP2) | F | TCTAGATTGGGCCTACCTCCTCTCTG | 681 | 58 | |
| | R | ATACAGGACCAACGTTGTCT | | | |
| NS1 | F | KTTGGTTGCTTTACTCC | 500 | 54 | Canuti i wsp., 2016 |
| | R | RTCTACTTTTACATCACCAC | | | |

Reakcję PCR przeprowadzono w następujących warunkach: denaturacja wstępna w temperaturze 95 °C przez 10 minut, następnie 40 cykli składających się z denaturacji w 95 °C przez 45 sekund, przyłączania starterów w 54 °C przez 45 sekund oraz wydłużania nici w 72 °C przez 45 sekund. Na końcu wykonano wydłużanie końcowe w 72 °C przez 10 minut (Tabela 4). Reakcję przeprowadzono w termocyklerze Labcycler (SensoQuest, Getynga, Niemcy).

Tabela 4. Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR.

| Etap | Temperatura | Czas | Liczba cykli |
|---------------------|-------------|--------|--------------|
| Denaturacja wstępna | 95°C | 10 min | 1 |
| Denaturacja | 95°C | 45 s | } x 40 |
| Wiązanie starterów | 54°C | 45 s | |
| Wydłużanie nici | 72°C | 45 s | |
| Końcowe wydłużanie | 72°C | 10 min | 1 |
| Przechowywanie | 4°C | | |

Obecność i specyficzność produktów PCR oceniono za pomocą elektroforezy na 1% żelu agarozowym przy napięciu 80 V w czasie 120 minut. Wizualizacja i dokumentacja żelu zostały wykonane w świetle UV w obecności znacznika fluorescencyjnego w postaci bromku etydyny (EtBr), przy użyciu programu Scion Image.

3.4. Ocena polimorfizmu pojedynczych nukleotydów (SNP) sekwencji genów *SRSF5*, *RNF165*, *SKOR2*

3.4.1. Projektowanie starterów do reakcji PCR za pomocą Primer Blast

Geny do badań, *SRSF5*, *RNF165* oraz *SKOR2* zostały wytypowane na podstawie publikacji pt. „Detection of selection signatures for response to Aleutian mink disease virus infection in American mink” autorstwa Karimi i wsp. z 2021 roku. Następnie w bazie informacji genomowych Ensembl wyszukano je według takich kryteriów jak nazwa genu i przynależność gatunkowa. W ten sposób otrzymano pliki w formacie FASTA z wyróżnionymi eksonami, które w kolejnym etapie posłużyły do zaprojektowania starterów.

Startery do reakcji PCR dla ośmiu eksonów genu *SRSF5*, ośmiu eksonów genu *RNF165* oraz siedmiu eksonów genu *SKOR2* zostały zaprojektowane z wykorzystaniem platformy Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). W trakcie projektowania starterów uwzględniono takie parametry jak rozmiar produktu PCR, temperatury topnienia starterów (T_m) oraz maksymalną dopuszczalną różnicę T_m . Wartości tych parametrów przedstawiono w Tabeli 5. Ponadto zwracano uwagę by unikać tworzenia struktur drugorzędowych czy struktury spinki do włosów. Dodatkowo, zwrócono uwagę na ograniczenie powtórzeń di nukleotydów AT do maksymalnie 3 oraz unikanie tworzenia struktur drugorzędowych, w tym struktury typu spinki do włosów.

Tabela 5. Parametry uwzględnione podczas projektowania starterów do reakcji PCR.

| Parametr | Wartość/Zakres wartości |
|--|-------------------------|
| Rozmiar produktu PCR | 100-600 nukleotydów |
| Temperatura topnienia startera (T_m) | |
| - minimalna | 48°C |
| - maksymalna | 60°C |
| Maksymalna różnica T_m | 3°C |
| Zawartość par GC | 40-60% |
| Ilość powtórzeń dinukleotydów AT | <4 razy |

Sekwencje zaprojektowanych starterów dla poszczególnych eksonów genu *SRSF5* zamieszczono w tabeli 6., natomiast dla genu *RNF165* w tabeli 7. oraz dla genu *SKOR2* w tabeli 8.

Tabela 6. Charakterystyka starterów stosowanych w reakcji PCR dla ośmiu eksonów genu *SRSF5* z uwzględnieniem długości produktów PCR [pz], temperatur topnienia [°C] oraz procentowej zawartości zasad GC [%].

| Nr eksonu | F/R | Sekwencja | Długość produktu [pz] | Tm [°C] | GC [%] |
|-----------|-----|-------------------------|-----------------------|---------|--------|
| 1 | F | CATCCCGGGTACAGGTCTCC | 353 | 57,9 | 65 |
| | R | ACGATCTGAACGGCCATGAA | | 51,8 | 50 |
| 2 | F | TGACCAGGCATTCTTCGGAC | 333 | 53,8 | 55 |
| | R | CCCTCCAACCTAACAGCGAGG | | 55,9 | 60 |
| 3 | F | TCTTGACGTGGTTTTGGTGC | 260 | 51,8 | 50 |
| | R | GGCTCTGTTATCCACACAAGC | | 54,4 | 52 |
| 4 | F | AGCTGTCAGGTAGCTTGTGT | 177 | 51,8 | 50 |
| | R | AGCAGCCATTCACGATCCAT | | 51,8 | 50 |
| 5 | F | AATCTGCCCACAGTCGAACA | 152 | 51,8 | 50 |
| | R | ACAAACCTGCCAGCTGACTC | | 53,8 | 55 |
| 6 | F | TTCCTTTTCTTCGCGTGACA | 365 | 49,7 | 45 |
| | R | GGCTGTTAAGACCTTCAAAACAT | | 51,7 | 39 |
| 7 | F | TTGGAGGTGGAGGAACCTTG | 400 | 53,8 | 55 |
| | R | AGACCTGCTCCGTGACCTAC | | 55,9 | 60 |
| 8 | F | TTAGTTGGTGGGTTTGTAGCTC | 363 | 53,0 | 45 |
| | R | GCCCCCAGGGCAAGTTATT | | 53,8 | 55 |

Tabela 7. Charakterystyka starterów do reakcji PCR dla ośmiu eksonów genu *RNF165*, z uwzględnieniem długości produktów PCR [pz], temperatur topnienia [°C] oraz procentowej zawartości zasad GC [%].

| Nr eksonu | F/R | Sekwencja | Długość produktu [pz] | Tm [°C] | GC [%] |
|-----------|-----|-----------------------|-----------------------|---------|--------|
| 1 | F | GGCTATCTCGTGCTTCCAGT | 265 | 53,8 | 55 |
| | R | GGGACCCAAATTCGCCAAAC | | 53,8 | 55 |
| | F | GCTTCCAGTGTTTGGCTCTG | 255 | 53,8 | 55 |
| | R | AGGGACCCAAATTCGCCAAA | | 51,8 | 50 |
| 2 | F | CTCCAGGTGCCCTTTTCAA | 451 | 53,8 | 55 |
| | R | AGTAAAAGCTACCTCCCGCAC | | 54,4 | 52 |
| | F | CTCTCCAGGTGCCCTTTTC | 451 | 55,9 | 60 |
| | R | TAAAAGCTACCTCCCGCACAG | | 54,4 | 52 |
| | F | AAGGTCTCAGCATCCTCACG | 433 | 53,8 | 55 |
| | R | CAGTAAAAGCTACCTCCCGCA | | 54,4 | 52 |
| 3 | F | TGTAAGCTGTAGGCTCAGGC | 302 | 53,8 | 55 |
| | R | GCCTCCTGCATCATTCAACA | | 51,8 | 50 |
| 4 | F | CTCTGAGTCTTGTGTCTGGGG | 331 | 56,3 | 57 |
| | R | GGAGGGGAGGACAGCATGAC | | 57,9 | 65 |
| 5 | F | ACTGACGAATCTCAGGGGTG | 220 | 53,8 | 55 |
| | R | GGGCGTACCTCATAGCTCTC | | 55,9 | 60 |
| 6 | F | CCCTCCCTCCGTATTGTGTG | 203 | 55,9 | 60 |
| | R | GGCTGACACACTAGCAGACT | | 53,8 | 55 |
| 7 | F | AGCTGCTCCAGGTAACGGAT | 171 | 53,8 | 55 |
| | R | ACAGAAGGAGCGGGTCTCTTA | | 54,4 | 52 |
| 8 | F | GTGATAGCCAGTATCGCGCC | 277 | 55,9 | 60 |
| | R | GTTTGGCTGCAAGGGCTATG | | 53,8 | 55 |

Tabela 8. Charakterystyka starterów stosowanych w reakcji PCR dla siedmiu eksonów genu *SKOR2*, z uwzględnieniem długości produktów PCR [pz], temperatur topnienia [°C] oraz procentowej zawartości zasad GC [%].

| Nr eksonu | F/R | Sekwencja | Długość produktu [pz] | Tm [°C] | GC [%] |
|-----------|-----|--------------------------|-----------------------|---------|--------|
| 1 | F | TTGGGGTTTTGATGACCAAC | 677 | 49,7 | 45 |
| | R | CGGTTGTGGATCTCGTTGTA | | 51,8 | 50 |
| | F | TCACCGTTGCTGCTACTACC | 295 | 53,8 | 55 |
| | R | TCTCCTCATCTTCCTCCTCCTC | | 56,7 | 55 |
| 2 | F | TGATGCTTCTTCCTGCTGACT | 140 | 52,4 | 48 |
| | R | TTGCTGTTCGTCCTTTGTAGGT | | 52,4 | 48 |
| 3 | F | TCTGCCATCAGCCCTTGAAA | 251 | 51,8 | 50 |
| | R | CTCCCCGGCATCTGACTATT | | 53,8 | 55 |
| 4 | F | GCTCGGCGCTCAGCATAGAA | 327 | 55,9 | 60 |
| | R | AGCTTAAAGTATGGCGTAGAACGA | | 54 | 42 |
| 5 | F | ATATGGACCATTGGGTGGAT | 195 | 49,7 | 45 |
| | R | CCCATGGCATTTTACACAAGC | | 52,4 | 48 |
| 6 | F | TTCCCTTCCAACAGCCACAT | 350 | 51,8 | 50 |
| | R | GGACCAAAGAGTTTCACGGC | | 53,8 | 55 |
| 7 | F | GAAAAGCTTGGTGCCCATCTC | 193 | 54,4 | 52 |
| | R | CATGCCTGGGCATAACAAAGT | | 52,4 | 48 |

3.4.2. Optymalizacja reakcji łańcuchowej polimerazy

Aby poprawić wydajność amplifikacji materiału genetycznego, przeprowadzono reakcję PCR w gradiencie stężeń jonów magnezu. Jony te odgrywają rolę kofaktora w reakcjach PCR, stabilizując wiązanie polimerazy z matrycą DNA oraz katalizując przyłączanie dNTP-ów do wydłużającego się łańcucha DNA. Uwzględniono trzy różne stężenia jonów Mg^{2+} : 1,5mM; 2mM i 2,5mM. Najlepszą wydajność amplifikacji otrzymano dla stężenia 2,5mM.

Doświadczalnie opracowano master mix, który pozwala na wydajną amplifikację materiału genetycznego norki (Tabela 9). Do sporządzenia mixu wykorzystano zestaw zawierający polimerazę Taq - AmpliTaq Gold 360 DNA Polymerase (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific Incorporated, USA).

Tabela 9. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR

| Skład | Odczynnik | Objętość na 1 próbę [μl] |
|-------|-----------------------------------|--------------------------|
| Mix | H ₂ O wolna od nukleaz | 14,7 |
| | Bufor 10 x PCR | 2,43 |
| | Bufor G/C | 1,13 |
| | Mg ²⁺ | 2,0 |
| | DTP | 2,0 |
| | Polimeraza Taq Gold | 0,14 |
| | Starter F | 0,3 |
| | Starter R | 0,3 |
| DNA | Matryca | 2,0 |

W celu optymalizacji profilu termicznego reakcji PCR przeprowadzono reakcję w gradiencie temperatury 50-65°C dla etapu hybrydyzacji primerów (Tabela 10). Amplifikację przeprowadzono w termocyklerze Labcycler firmy SensoQuest.

Tabela 10. Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR

| Etap | Temperatura | Czas | Liczba cykli |
|---------------------|-------------|--------|--------------|
| Denaturacja wstępna | 95°C | 10 min | 1 |
| Denaturacja | 95°C | 30 s | 36 |
| Wiązanie starterów | * | 45 s | |
| Wydłużanie nici | 72°C | 60 s | |
| Końcowe wydłużanie | 72°C | 10 min | 1 |
| Przechowywanie | 4°C | | - |

* - temperatury wiązania starterów dobrane indywidualnie dla każdego startera i eksonu w każdym z badanych genów

3.4.3. Ocena elektroforetyczna produktów PCR

W celu sprawdzenia długości otrzymanych fragmentów DNA, produkty amplifikacji poddano rozdzielni elektroforetycznej. Analizę wykonano na żelu agarozowym o stężeniu 2% w obecności buforu 1 x TBE oraz bromku etydy (EtBr), wykorzystując markery wielkości: DNA Marker 1 oraz DNA Marker 2 (A&A Biotechnology, Polska). Reakcję prowadzono przy stałym napięciu 80V w czasie 120 minut. Archiwizację żelu przeprowadzono za pomocą programu ScionImage.

3.5. Reakcja sekwencjonowania materiału genetycznego

3.5.1. Oczyszczanie produktu PCR

Produkty reakcji PCR zostały oczyszczone metodą enzymatyczną z niezwiązanych starterów i dNTPów zestawem EPPiC Fast (A&A Biotechnology). W celu oczyszczenia produktu PCR do 5µl mieszaniny poreakcyjnej PCR dodano 1µl mieszaniny EPPiC Fast (zawierającej dwa enzymy aktywnie hydrolizujące nukleotydy oraz startery, lecz nie usuwające grup 5'-fosforanowych). Wymieszano zawartość przez pipetowanie i krótko zwirowano. Następnie umieszczono mieszaniny reakcyjne w termocyklerze, gdzie inkubowano 5 minut w temperaturze 37°C oraz 1 minutę w temperaturze 80°C w celu inaktywacji enzymu. Oczyszczone produkty reakcji PCR zostały wykorzystane do przeprowadzenia reakcji PCR sekwencyjnego.

3.5.2. PCR sekwencyjny (asymetryczny)

Reakcję przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific Incorporated, USA) w termocyklerze LabCycler (SensoQuest, Niemcy).

Objętość końcowa próby reakcyjnej wynosiła 10µl. Startery zostały 20-krotnie rozcieńczone. Reakcję PCR asymetrycznego przeprowadzono z użyciem starterów o tej samej sekwencji co w PCR preparatywnym. Dla każdej próby przeprowadzono reakcję oddzielnie ze starterem F i R w celu zestawienia contigów na etapie analiz bioinformatycznych. Skład mixu reakcyjnego PCR sekwencyjnego przedstawiono w tabeli 11. Reakcję przeprowadzono zgodnie z profilem termicznym określonym w tabeli 12.

Tabela 11. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR sekwencyjnego

| Odczynnik | | Objętość na 1 próbę [µl] |
|-----------|---|--------------------------------|
| Mix | H ₂ O wolna od nukleaz | 4,375 |
| | BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit BigDye | 0,25 |
| | BigDye® Terminator 5X Sequencing Buffer | 0,875 |
| | BDX64 (BigDye® Bufor Wzmacniający-MCLAB) | 2 |
| | Starter F/R (20x rozcieńczony) | 1 |
| Matryca | | 1,5 |

Tabela 12. Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR sekwencyjnego

| Etap | Temperatura [°C] | Czas | Liczba cykli |
|------------------------|-------------------------|-------------|---------------------|
| Denaturacja wstępna | 96 | 3min | 1 |
| Denaturacja | 96 | 10s | } 30 |
| Hybrydyzacja starterów | 50 | 5s | |
| Elongacja/wydłużanie | 60 | 2min | |

3.5.3. Oczyszczanie produktów PCR sekwencyjnego

Oczyszczanie produktów asymetrycznego PCR przeprowadzono z wykorzystaniem komercyjnego zestawu ExTerminator (A&A Biotechnology, Polska). Celem tego etapu prac było usunięcie nadmiaru niewbudowanych nukleotydów, zarówno dNTP jak i ddNTP, a także niezwiązanych primerów. Do mieszaniny reakcyjnej po PCR sekwencyjnym (10µl) dodano 5µl odczynnika Mix Blue oraz 100µl roztworu wiążąco-płuczącego WP. Całość wymieszano przez pipetowanie i naniesiono na minikolumny. Następnie wirowano przez 30 sekund z prędkością 20 000 x g (14 000 obr./min). Naniesiono na minikolumny po 400µl roztworu wiążąco-płuczącego WP i wirowano przez 2 minuty z prędkością 20 000 x g (14 000 obr./min). Minikolumny przeniesiono do nowych probówek typu Eppendorf o pojemności 1,5ml, po czym na złoża mini kolumn w celu elucji dodano 25µl sterylnej wody destylowanej, wolnej od nukleaz. Po dwuminutowej inkubacji w temperaturze pokojowej oraz wirowaniu przez 1 minutę z prędkością 20 000 x g (14 000 obr./min), próby zostały poddane denaturacji termicznej w temperaturze 95°C.

3.5.4. Rozdział produktów PCR sekwencyjnego

Przed przystąpieniem do sekwencjonowania, do oczyszczonych prób DNA dodano 20µl formamidu, wymieszano przez kilkukrotne pipetowanie oraz inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 minut w celu uzyskania jednorodnej mieszaniny. Po zakończeniu inkubacji, zawartość probówek typu Eppendorf przeniesiono do studzienek 96-dołkowej płytki. W celu denaturacji dwuniciowego DNA, płytkę umieszczono w termocyklerze na 5 minut, utrzymując temperaturę 95°C. Następnie, aby zatrzymać proces denaturacji i zapobiec renaturacji nici DNA, próbki natychmiast schłodzono przez umieszczenie płytki na lodzie na okres 5 minut. Elektroforezę kapilarną tak przygotowanych produktów PCR sekwencyjnego prowadzono na

analizatorze genetycznym ABI Prism® 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) zgodnie z optymalnymi parametrami opisanymi w tabeli 13.

Tabela 13. Parametry elektroforezy kapilarnej przeprowadzonej przy użyciu analizatora genetycznego ABI Prism® 3100 Avant, zastosowane do sekwencjonowania metodą Sangera.

| Parametr | Wielkość |
|--|----------|
| Długość kapilary | 50cm |
| Polimer | POP 6 |
| Czas iniekcji | 15s |
| Napięcie prądu podczas elektroforezy właściwej | 15kV |
| Czas elektroforezy na jeden cykl | 2,5 h |
| Temperatura elektroforezy | 60°C |

3.6. Analiza bioinformatyczna

Wyniki sekwencjonowania stanowiły pliki w formacie ab1. Analizę wyników przeprowadzono w programie Chromas 2.6.6 (<https://technelysium.com.au/wp/chromas/>). Uzyskane sekwencje były podstawą do dalszej analizy i posłużyły do składania contigów w aplikacji CAP3 (<https://doua.prabi.fr/software/cap3>) (Huang i Madan, 1999).

3.6.1. Analiza sekwencji nukleotydowych za pomocą programu BLAST

Sekwencje referencyjne genów *SRSF5*, *RNF165*, *SKOR2* norki amerykańskiej, pobrane z platformy Ensembl, porównano z danymi dostępnymi w bioinformatycznej bazie NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) za pomocą narzędzia BLAST. Miejsca polimorficzne zostały wskazane przy użyciu narzędzia MSA Viewer, wbudowanego w aplikację BLAST. Aplikacja ta umożliwiła również stworzenie drzewa filogenetycznego, które zilustrowało pokrewieństwo pomiędzy sekwencjami referencyjnymi norki amerykańskiej a ich homologami u innych gatunków, wykorzystując metodę NJ (*Neighbor-Joining*).

Uzyskane sekwencje genów dla osobników pochodzących z grupy nerek hodowlanych oraz dla osobników z grupy nerek dziko żyjących porównano z sekwencją referencyjną za pomocą narzędzia BLAST. Określono miejsca polimorficzne i na ich podstawie wygenerowano drzewo filogenetyczne metodą NJ.

3.6.2. Analiza sekwencji w programie MEGA 11

Kolejnym krokiem w analizie sekwencji nukleotydowych było porównanie wszystkich sekwencji nukleotydowych przy użyciu algorytmu wielokrotnego dopasowania sekwencji (*Multiple Sequence Alignment, MSA*) w programie Mega 11, który pozwala na równoczesne porównanie wielu sekwencji, uwzględniając zarówno podobieństwa, jak i różnice między nimi, a także wagi dla poszczególnych substytucji (Tamura i wsp., 2021). Algorytm ten, dzięki zastosowaniu progresywnego dopasowywania, umożliwił stworzenie wielowymiarowego obrazu różnic i podobieństw pomiędzy sekwencjami, co pozwoliło na precyzyjną identyfikację miejsc polimorficznych.

Po zakończeniu analizy sekwencji nukleotydowych, dokonano translacji tych sekwencji na odpowiadające im sekwencje aminokwasowe. Porównanie sekwencji aminokwasowych miało na celu identyfikację polimorfizmów aminokwasowych występujących pomiędzy analizowanymi osobnikami.

3.6.3. Analiza efektów funkcjonalnych substytucji za pomocą programu SNAP2

Do oceny potencjalnych skutków funkcjonalnych wykrytych substytucji aminokwasowych zastosowano narzędzie SNAP2, które pozwala na prognozowanie wpływu mutacji na funkcje białka. SNAP2 uwzględnia zarówno konserwatywność pozycji aminokwasowych, jak i charakterystykę fizykochemiczną aminokwasów, co umożliwia oszacowanie, czy dana substytucja może wpłynąć na strukturę lub funkcję białka. Wyniki analizy SNAP2 zostały następnie zwizualizowane w postaci heatmapy, która przedstawiała lokalizację substytucji aminokwasowych w analizowanych sekwencjach oraz ich potencjalny efekt. Mapa ta stanowiła kluczowe narzędzie analityczne, umożliwiając szybkie zidentyfikowanie regionów o zwiększonym polimorfizmie oraz wskazanie obszarów mogących mieć istotne znaczenie biologiczne.

4. Wyniki

4.1. Izolacja DNA

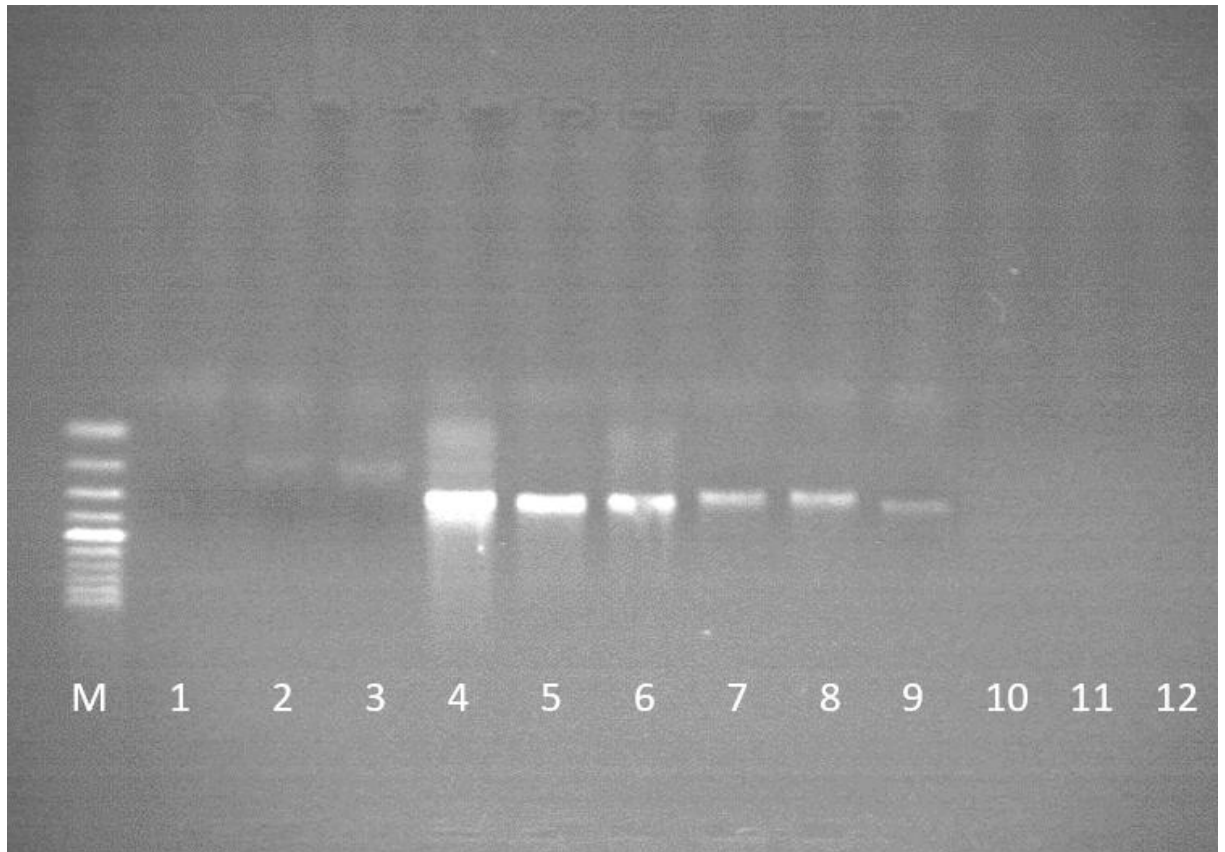
W wyniku izolacji materiału genetycznego od nerek pochodzących z dwóch grup badawczych (populacja hodowlana oraz populacja dziko żyjąca) uzyskano DNA o dobrej jakości, co zostało potwierdzone analizą elektroforetyczną. Przeprowadzone na żelu agarozowym elektroforezy wykazały prawidłową migrację izolowanego DNA, co można zaobserwować na przykładowym elektroforegramie przedstawionym na rycinie 7. Uzyskane prążki były wyraźne i jednorodne, co wskazuje na brak degradacji materiału genetycznego oraz jego odpowiednią ilość i jakość. Wyniki te potwierdzają, że izolowane DNA było odpowiednie do dalszych analiz molekularnych.



Ryc.7. Rozdział elektroforetyczny produktu izolacji materiału genetycznego nerek: ścieżki 1-3 – materiał genetyczny nerek pochodzących z populacji hodowlanej, ścieżki 4-6 – materiał genetyczny nerek dziko żyjących

4.2. Optymalizacja warunków termicznych reakcji PCR

W ramach optymalizacji termicznej reakcji PCR dla starterów każdego z 8 eksonów genu *SRSF5*, 8 eksonów genu *RNF165* oraz 7 eksonów genu *SKOR2* przeprowadzono reakcje w gradiencie temperatury. Z uwagi na to, iż temperatura topnienia starterów (T_m) zależy m.in. od ich składu nukleotydowego, temperatury przyłączania starterów (T_a) uzyskane z programu PrimerBlast dobierano indywidualnie w przypadku każdej pary starterów dla poszczególnych eksonów w zakresie $\pm 5^\circ\text{C}$.



Ryc. 8. Wybrany rozdział elektroforetyczny produktów reakcji amplifikacji genu *SKOR2* exon 1_P5 w gradiencie temperatury [$^\circ\text{C}$] ścieżka:

- M – marker wielkości DNA Marker 1
- 1 – temperatura wiązania starterów – 50
- 2 – temperatura wiązania starterów – 50.5
- 3 – temperatura wiązania starterów – 51.3
- 4 – temperatura wiązania starterów – 52.2
- 5 – temperatura wiązania starterów – 53.3
- 6 – temperatura wiązania starterów – 54.4
- 7 – temperatura wiązania starterów – 55.6
- 8 – temperatura wiązania starterów – 56.7
- 9 – temperatura wiązania starterów – 57.8
- 10 – temperatura wiązania starterów – 58.7
- 11 – temperatura wiązania starterów – 59,5
- 12 – temperatura wiązania starterów – 60

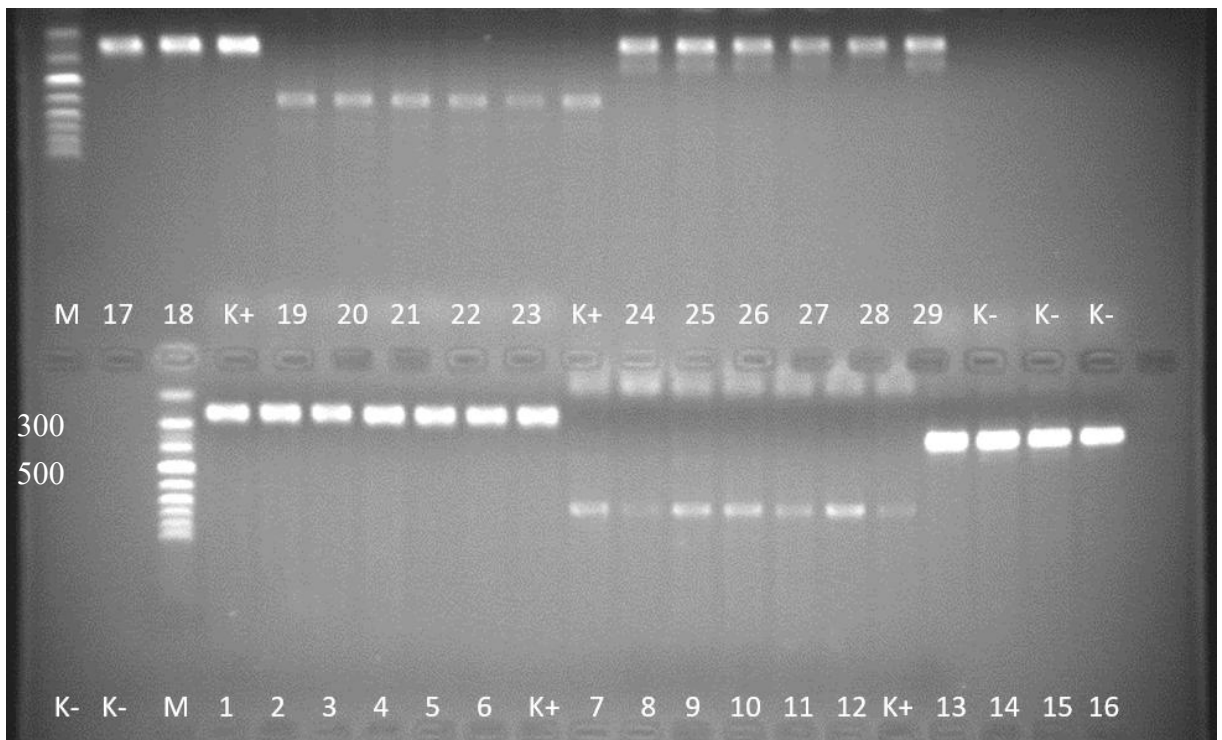
Na podstawie elektroforegramów po PCR w gradiencie temperatury określono, jakiej temperaturze odpowiada najbardziej wyraźny prążek, a więc dobrano temperatury annealingu. Przykładowo, dla przedstawionych na ryc. 8. produktów PCR genu *SKOR2* exonu 1_P5 za najbardziej optymalną T_a uznano 53°C. Dzięki optymalizacji uzyskano warunki reakcji PCR, które pozwoliły na efektywne i specyficzne amplifikowanie wszystkich badanych eksonów, co potwierdza skuteczność dobranej strategii temperaturowej. Eksperymentalnie wyznaczone optymalne temperatury wiązania starterów (T_a) dla poszczególnych eksonów badanych genów zostały zestawione w tabeli 14. Wyniki te pokazują, że każda para starterów w celu efektywnej amplifikacji wymagała specyficznych warunków temperaturowych.

Tabela 14. Optymalne temperatury wiązania starterów (T_a) dla eksonów badanych genów

| Nazwa genu | Numer eksonu | Doświadczalnie wyznaczona T_a [°C] |
|---------------|--------------|--------------------------------------|
| <i>SRSF5</i> | 1 | 54 |
| | 2 | 59 |
| | 3 | 54 |
| | 4 | 54 |
| | 5 | 54 |
| | 6 | 54 |
| | 7 | 53 |
| | 8 | 54 |
| <i>RNF165</i> | 1 | 59 |
| | 2 | 59 |
| | 3 | 58 |
| | 4 | 65 |
| | 5 | 54 |
| | 6 | 58 |
| | 7 | 58 |
| | 8 | 58 |
| <i>SKOR2</i> | 1_P5 | 53 |
| | 1_Prim | 54 |
| | 2 | 53 |
| | 3 | 51 |
| | 4 | 51 |
| | 5 | 51 |
| | 6 | 51 |
| 7 | 54 | |

4.3. Reakcja łańcuchowej polimerazy

Produkty reakcji PCR oceniano podczas rozdziału elektroforetycznego pod kątem obecności prążków o oczekiwanej długości. Na przykład, produkty amplifikacji dla eksonu 3 genu *SKOR2* zostały zaobserwowane na elektroforegramie jako wyraźne prążki na wysokości pomiędzy 200 pz a 300 pz, co przedstawiono na ryc. 9. Uzyskane wyniki potwierdzają specyficzną reakcję PCR oraz prawidłową amplifikację docelowych sekwencji.



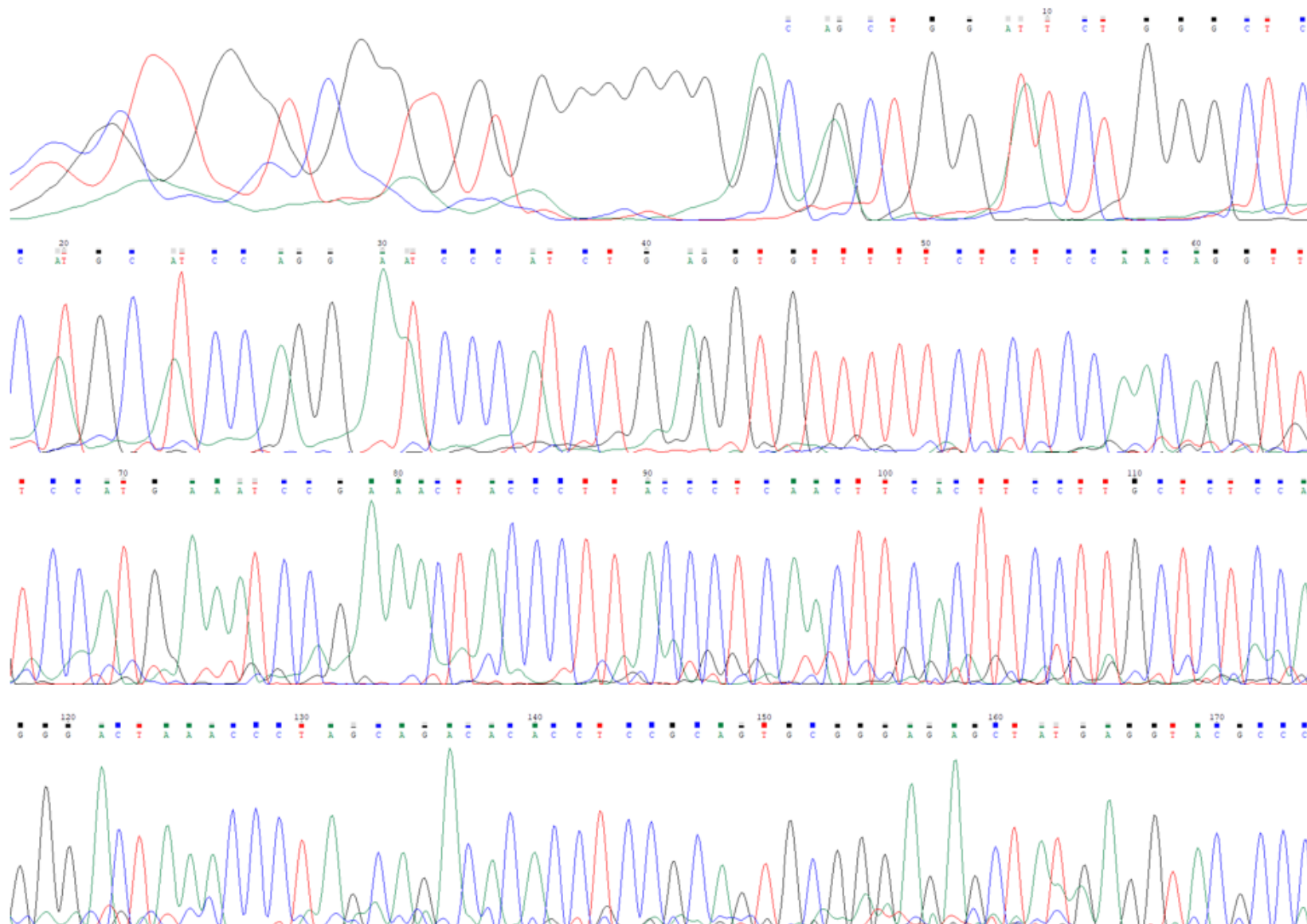
Ryc. 9. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji amplifikacji badanych fragmentów genów w ustalonej eksperymentalnie optymalnej temperaturze, ścieżka:

- M– marker wielkości DNA Marker 1
- K- –kontrola negatywna
- K+ –kontrola dodatnia
- 1 – 6, *SKOR2*, ekson – 3 (251pz)
- 7 –12, *SKOR2*, ekson – 1_Prim (802pz)
- 13 – 18, *SKOR2*, ekson – 1_P5 (400pz)
- 19 – 23, *RNF165*, ekson – 1 (587pz)
- 24 – 29, *RNF165*, ekson – 4 (331pz)

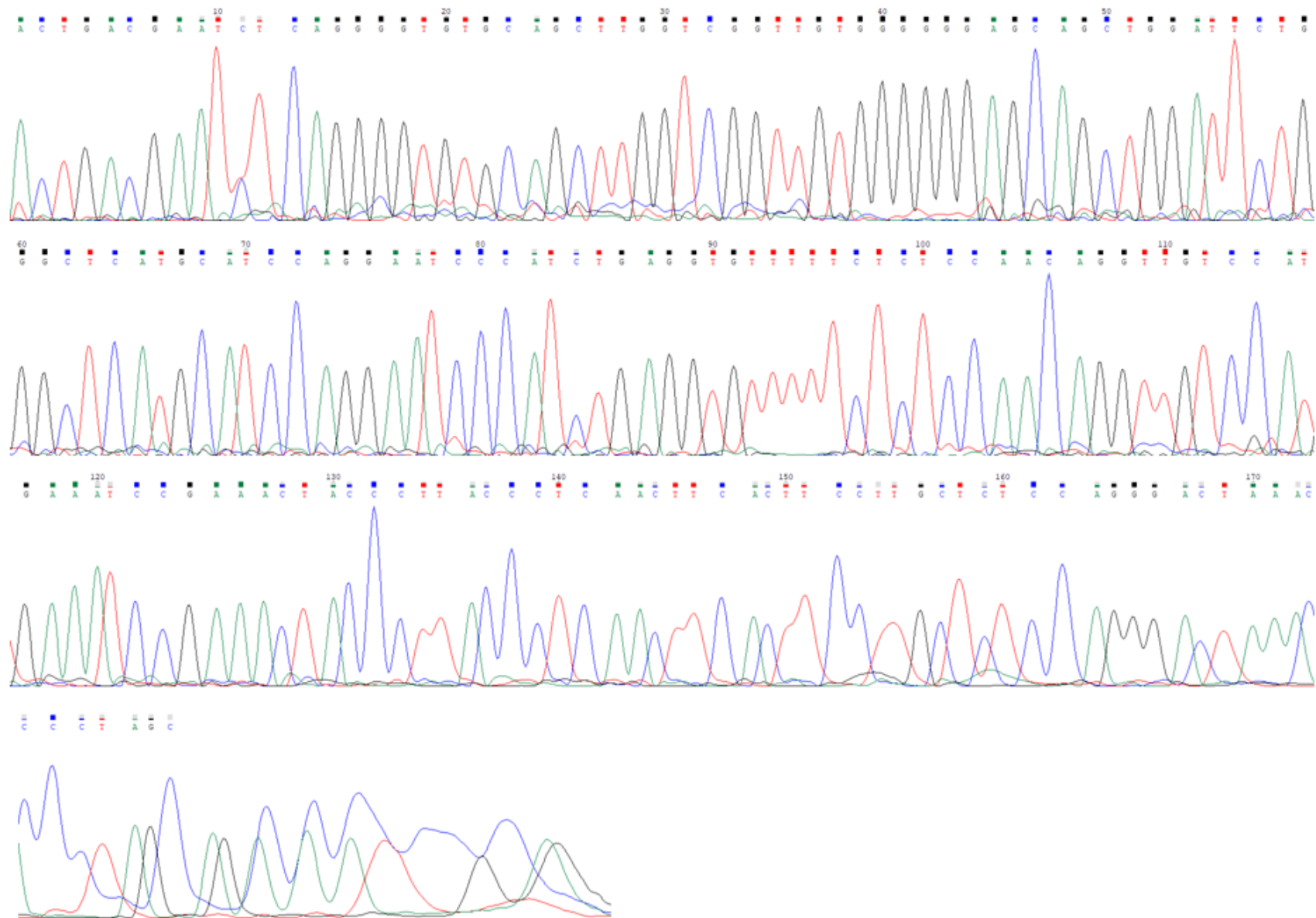
4.4. Sekwencjonowanie metodą terminacji łańcucha

Po przeprowadzeniu sekwencjonowania metodą Sangera otrzymano chromatogramy (w postaci plików formatu AB1) dla starterów F i R dla każdego eksonu badanych genów (ośmiu eksonów genu *SRSF5*, ośmiu eksonów genu *RNF165* oraz siedmiu eksonów genu *SKOR2*) dla wybranych osobników hodowlanych oraz dziko żyjących.

Otrzymane chromatogramy (łącznie 276) stanowią graficzną reprezentacją sygnałów fluorescencyjnych odpowiadających poszczególnym nukleotydom w sekwencjonowanej próbce. Na rycinie 10. przedstawiono przykładowy chromatogram uzyskany podczas sekwencjonowania piątego eksonu genu *RNF165* z użyciem startera F (forward). Piki widoczne na chromatogramie reprezentują konkretne nukleotydy, które zostały zidentyfikowane na podstawie intensywności i barwy sygnałów fluorescencyjnych. Każdy pik na chromatogramie odpowiada jednemu z czterech nukleotydów (A, T, C, G), a jego pozycja na osi poziomej wskazuje na kolejność nukleotydów w sekwencji. Analogicznie, na rycinie 11. przedstawiono chromatogram uzyskany z sekwencjonowania tego samego fragmentu DNA, ale przy użyciu startera R (reverse).



Ryc. 10. Chromatogram przedstawiający sekwencję uzyskaną przy użyciu startera F dla eksonu 5 genu *RNF165* u pierwszego osobnika z grupy hodowlanej.



Ryc. 11. Chromatogram przedstawiający sekwencję uzyskaną przy użyciu startera R dla eksonu 5 genu *RNF165* u pierwszego osobnika z grupy hodowlanej. 60

W celu weryfikacji poprawności zapisu sekwencji DNA przeprowadzono szczegółową analizę chromatogramów. Najpierw dokonano wizualizacji danych chromatograficznych przy użyciu programu Chromas, co pozwoliło na dokładne zidentyfikowanie poszczególnych nukleotydów na podstawie oceny intensywności sygnałów fluorescencyjnych. Następnie, przeprowadzono ręczne redagowanie błędnie zidentyfikowanych nukleotydów, co umożliwiło skorygowanie ewentualnych artefaktów powstałych podczas sekwencjonowania. Dodatkowo, usunięto nieprawidłowo rozpoznane przez algorytm *base callingu* fragmenty sekwencji na końcach odczytów, które mogły zaniżać precyzję uzyskanych wyników. Po zakończeniu analizy chromatogramów, zredagowane sekwencje DNA zapisano w formacie Fasta. Tak przygotowane sekwencje piątego eksonu genu *RNF165* dla osobnika o numerze 5.1 zostały dla przykładu przedstawione na rycinach 12. i 13. Rycina 12. ilustruje sekwencję uzyskaną przy użyciu startera F, natomiast rycina 13. przedstawia sekwencję uzyskaną przy użyciu startera R.

```
>5.1F
CAGCTGGATTCTGGGCTCATGCATCCAGGAATCCCATCTGAGGTGTTTTCTCTCCAACA
GGTTGTCCATGAAATCCGAAACTACCCCTTACCCTCAACTTCACTTCCTTGCTCTCCAGGG
ACTAAACCTTAGCAGACACACCTCCGCAGTGCGGGAGAGCTATGAGGTACGCCC
```

Ryc. 12. Sekwencja nukleotydomowa uzyskana przy użyciu startera F dla eksonu 5 genu *RNF165* u pierwszego osobnika z grupy hodowlanej.

```
>5.1R
ACTGACGAATCTCAGGGGTGTGCAGCTTGGTTCGGTTGTGGGGGAGCAGCTGGATTCTGG
GCTCATGCATCCAGGAATCCCATCTGAGGTGTTTTCTCTCCAACAGGTTGTCCATGAAA
TCCGAAACTACCCCTTACCCTCAACTTCACTTCCTTGCTCTCCAGGGACTAAACCTAGC
```

Ryc. 13. Sekwencja nukleotydomowa uzyskana przy użyciu startera R dla eksonu 5 genu *RNF165* u pierwszego osobnika z grupy hodowlanej.

Uzyskane sekwencje nukleotydomowe F i R dla poszczególnych osobników, należących do dwóch grup badawczych, obejmujące 8 eksonów genu *SRSF5*, 8 eksonów genu *RNF165* oraz 7 eksonów genu *SKOR2* (łącznie 138 sekwencji F oraz 138 sekwencji R), zostały zestawione w contigi za pomocą oprogramowania CAP3 (<https://doua.prabi.fr/software/cap3>) (Huang i Madan, 1999). Przykład zestawionego contigu oraz szczegóły procesu łączenia przedstawiono na rycinach 14 i 15, odpowiednio.

```

>5.1
ACTGACGAATCTCAGGGGTGTGCAGCTTGGTTCGGTTGTGGGGGGAGCAGCTGGATTCTGG
GCTCATGCATCCAGGAATCCCATCTGAGGTGTTTTTCTCTCCAACAGGTTGTCCATGAAA
TCCGAAACTACCCTTACCCTCAACTTCACTTCCTTGCTCTCCAGGGACTAAACCCTAGCA
GACACACCTCCGCAGTGC GGGGAGAGCTATGAGGTACGCC

```

Ryc. 14.Contig zestawiony za pomocą oprogramowania CAP3 dla eksonu 5 genu *RNF165* u pierwszego osobnika pochodzącego z grupy nerek hodowlanych.

```

DETAILED DISPLAY OF CONTIGS
***** Contig 1 *****
5.1R+      .   :   .   :   .   :   .   :   .   :   .   :
5.1F+      ACTGACGAATCTCAGGGGTGTGCAGCTTGGTTCGGTTGTGGGGGGAGCAGCTGGATTCTGG
                                     CAGCTGGATTCTGG

consensus  ACTGACGAATCTCAGGGGTGTGCAGCTTGGTTCGGTTGTGGGGGGAGCAGCTGGATTCTGG

5.1R+      .   :   .   :   .   :   .   :   .   :   .   :
5.1F+      GCTCATGCATCCAGGAATCCCATCTGAGGTGTTTTTCTCTCCAACAGGTTGTCCATGAAA
GCTCATGCATCCAGGAATCCCATCTGAGGTGTTTTTCTCTCCAACAGGTTGTCCATGAAA

consensus  GCTCATGCATCCAGGAATCCCATCTGAGGTGTTTTTCTCTCCAACAGGTTGTCCATGAAA

5.1R+      .   :   .   :   .   :   .   :   .   :   .   :
5.1F+      TCCGAAACTACCCTTACCCTCAACTTCACTTCCTTGCTCTCCAGGGACTAAACCCTAGC
TCCGAAACTACCCTTACCCTCAACTTCACTTCCTTGCTCTCCAGGGACTAAACCCTAGCA

consensus  TCCGAAACTACCCTTACCCTCAACTTCACTTCCTTGCTCTCCAGGGACTAAACCCTAGCA

5.1F+      .   :   .   :   .   :   .   :   .   :   .   :
consensus  GACACACCTCCGCAGTGC GGGGAGAGCTATGAGGTACGCC
                                     GACACACCTCCGCAGTGC GGGGAGAGCTATGAGGTACGCC

```

Ryc. 15. Szczegóły procesu łączenia przez program CAP3 sekwencji F i R dla eksonu 5 genu *RNF165* u pierwszego osobnika pochodzącego z grupy nerek hodowlanych.

Dla każdego eksonu badanych genów uzyskiwane contigi (x.1 - x.6) zestawiano z sekwencją referencyjną (x.0) w celu oceny powtarzalności i dokładności sekwencjonowania oraz obecności mutacji w analizowanych fragmentach. Na rycinie 16 przedstawiono sekwencję referencyjną (5.0) oraz sekwencje sześciu badanych osobników (5.1 - 5.6) w postaci contigów otrzymanych dla eksonu 5 genu *RNF165*. Wszystkie zsekwencjonowane fragmenty eksonu 5 genu *RNF165* wykazały 100% podobieństwa między sobą. Wynik ten wskazuje na brak zmienności genetycznej w obrębie analizowanego regionu u badanych osobników.

```

>5.0
ACTGACGAATCTCAGGGGTGTGCAGCTTGGTCGGTTGTGGGGGGAGCAGCTGGATTCTGG
GCTCATGCATCCAGGAATCCCATCTGAGGTGTTTTCTCTCCAACAGGTTGTCCATGAAA
TCCGAAACTACCCTTACCCTCAACTTCACTTCCTTGCTCTCCAGGGACTAAACCCTAGCA
GACACACCTCCGCAGTGCGGGAGAGCTATGAGGTACGCC

>5.1
ACTGACGAATCTCAGGGGTGTGCAGCTTGGTCGGTTGTGGGGGGAGCAGCTGGATTCTGG
GCTCATGCATCCAGGAATCCCATCTGAGGTGTTTTCTCTCCAACAGGTTGTCCATGAAA
TCCGAAACTACCCTTACCCTCAACTTCACTTCCTTGCTCTCCAGGGACTAAACCCTAGCA
GACACACCTCCGCAGTGCGGGAGAGCTATGAGGTACGCC

>5.2
ACTGACGAATCTCAGGGGTGTGCAGCTTGGTCGGTTGTGGGGGGAGCAGCTGGATTCTGG
GCTCATGCATCCAGGAATCCCATCTGAGGTGTTTTCTCTCCAACAGGTTGTCCATGAAA
TCCGAAACTACCCTTACCCTCAACTTCACTTCCTTGCTCTCCAGGGACTAAACCCTAGCA
GACACACCTCCGCAGTGCGGGAGAGCTATGAGGTACGCC

>5.3
ACTGACGAATCTCAGGGGTGTGCAGCTTGGTCGGTTGTGGGGGGAGCAGCTGGATTCTGG
GCTCATGCATCCAGGAATCCCATCTGAGGTGTTTTCTCTCCAACAGGTTGTCCATGAAA
TCCGAAACTACCCTTACCCTCAACTTCACTTCCTTGCTCTCCAGGGACTAAACCCTAGCA
GACACACCTCCGCAGTGCGGGAGAGCTATGAGGTACGCC

>5.4
ACTGACGAATCTCAGGGGTGTGCAGCTTGGTCGGTTGTGGGGGGAGCAGCTGGATTCTGG
GCTCATGCATCCAGGAATCCCATCTGAGGTGTTTTCTCTCCAACAGGTTGTCCATGAAA
TCCGAAACTACCCTTACCCTCAACTTCACTTCCTTGCTCTCCAGGGACTAAACCCTAGCA
GACACACCTCCGCAGTGCGGGAGAGCTATGAGGTACGCC

>5.5
ACTGACGAATCTCAGGGGTGTGCAGCTTGGTCGGTTGTGGGGGGAGCAGCTGGATTCTGG
GCTCATGCATCCAGGAATCCCATCTGAGGTGTTTTCTCTCCAACAGGTTGTCCATGAAA
TCCGAAACTACCCTTACCCTCAACTTCACTTCCTTGCTCTCCAGGGACTAAACCCTAGCA
GACACACCTCCGCAGTGCGGGAGAGCTATGAGGTACGCC

>5.6
ACTGACGAATCTCAGGGGTGTGCAGCTTGGTCGGTTGTGGGGGGAGCAGCTGGATTCTGG
GCTCATGCATCCAGGAATCCCATCTGAGGTGTTTTCTCTCCAACAGGTTGTCCATGAAA
TCCGAAACTACCCTTACCCTCAACTTCACTTCCTTGCTCTCCAGGGACTAAACCCTAGCA
GACACACCTCCGCAGTGCGGGAGAGCTATGAGGTACGCC

```

Ryc. 16. Zestawienie sekwencji pobranej z bazy Ensembl (5.0) oraz contigów otrzymanych dla eksonu 5 genu *RNF165* u trzech osobników z grupy nerek hodowlanych (5.1 - 5.3) oraz trzech osobników dziko żyjących (5.4 - 5.6).

W celu oceny polimorfizmu genetycznego badanych genów (*SRSF5*, *RNF165*, *SKOR2*) zebrano fragmenty zsekwencjonowanych eksonów, które następnie złożono w jeden contig dla każdego osobnika z grupy nerek hodowlanych oraz z grupy dziko żyjących. Wykorzystanie contigów, jako reprezentacji pełnej sekwencji genu dla każdego zwierzęcia, stanowiło podstawę dalszych analiz zmienności genetycznej, w tym identyfikację polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP, ang. *Single Nucleotide Polymorphism*) oraz typu indel. Wyniki te pozwoliły na zmapowanie zróżnicowania genetycznego w obrębie badanych sekwencji, a następnie analizę funkcjonalnych konsekwencji zidentyfikowanych polimorfizmów.

4.5. Polimorfizm sekwencji genu *SRSF5*

Jako odniesienie podczas oceny polimorfizmu molekularnego genu *SRSF5* u norki amerykańskiej (*Neogale vison*) zastosowano sekwencję referencyjną, zdeponowaną w bazie danych Ensembl pod numerem ENSNVIG00000010055.

Polimorfizm sekwencji genu *SRSF5* pobranej z bazy danych Ensembl względem innych sekwencji zdeponowanych w bazie NCBI (ang. *National Center for Biotechnology Information*) został oceniony przy użyciu algorytmu BLASTN (ang. *Basic Local Alignment Search Tool for Nucleotides*). Zastosowano bazę zapytania 'core_nt', a długość zapytania wynosiła 1048 nukleotydów. Wyniki analizy BLASTN dla sekwencji referencyjnej pokazujące listę homologicznych sekwencji u różnych gatunków zwierząt wraz z parametrami porównania, takimi jak zgodność procentowa, wartość E, maksymalny wynik, pokrycie zapytania, zamieszczono na rycinie 17. Gdy zawężono procent podobieństwa do 98%, zauważono, że wśród wyników pozostały sekwencje ssaków należących do rodziny łąsicowatych (*Mustelidae*). Wśród tych gatunków były: tchórz czarnołapy *Mustela nigripes*, wydra kanadyjska *Lontra canadensis*, fretka domowa *Mustela putorius furo*, norka europejska *Mustela lutreola*, wydra europejska *Lutra lutra*, gronostaj europejski *Mustela erminea*, borsuk europejski *Meles meles*. Najwyższa zgodność (99,90%) została uzyskana dla przewidywanej sekwencji genu *SRSF5* u *Neovison vison* (zdeponowaną pod numerem akcesyjnym XM_044232293.1). Maksymalny wynik (Max Score) wynosił 1823, co potwierdza wysoką homologiczność. Pozostałe sekwencje homologów genu *SRSF5*, u takich gatunków jak *Mustela putorius furo*, czy *Mustela erminea*, również wykazywały wysoką zgodność (powyżej 99%) i bardzo bliskie zero wartości E (E value), co świadczy o istotności porównywanych sekwencji. Wyniki sugerują, że badana sekwencja jest wysoce konserwatywna w obrębie rodziny łąsicowatych.

Na podstawie analizy z wykorzystaniem narzędzia MSA Viewer określono polimorfizm molekularny genu *SRSF5*, którego sekwencja została pobrana z bazy Ensembl, w porównaniu z innymi sekwencjami zdeponowanymi w bazie NCBI (rycina 18). Stwierdzono obecność kilku charakterystycznych różnic:

- Tranzycja 108G>A, polegająca na zamianie guaniny na adeninę w pozycji 108, została wykryta u gatunków *Mustela putorius furo*, *Mustela nigripes*, *Mustela lutreola* oraz *Mustela erminea*.
- Tranzycja 110A>G, czyli zamiana adeniny na guaninę w pozycji 110, występuje u *Lontra canadensis* i *Lutra lutra*.

- Transwersja 173A>C, oznaczająca zamianę adeniny na cytozynę, została stwierdzona u przedstawicieli rodziny łasicowatych, a także w dwóch przewidywanych sekwencjach genu *SRSF5* u *Neogale vison* (o numerach akcesyjnych XM_044232293.1 oraz XM_044232294.1).
- Tranzycja 466G>A występuje u *Lontra canadensis*, *Mustela nigripes*, *Mustela lutreola*, *Lutra lutra* oraz *Meles meles*.
- Transwersja 473A>C została wykryta u *Mustela putorius furo*, *Mustela nigripes* i *Mustela lutreola*.

Te obserwacje wskazują na zróżnicowanie sekwencji genu *SRSF5* w obrębie różnych gatunków rodziny łasicowatych. Również można stwierdzić, iż gen *SRSF5* byłby użyteczny w identyfikacji gatunkowej, gdyż u przedstawicieli rodziny łasicowatych w pozycji 173 występuje cytozyna, zaś u *Neogale vison* obecna jest adenina.

Na podstawie zebranych danych uzyskanych za pomocą algorytmu BLASTN skonstruowano drzewo filogenetyczne, przedstawione na rycinie 19. Filogram, wykonany metodą Neighbor Joining, ilustruje relacje ewolucyjne pomiędzy różnymi gatunkami z rodziny *Mustelidae*, bazując na sekwencjach genu *SRSF5*. Drzewo zostało wygenerowane na podstawie danych dotyczących wariantów transkryptów tego genu. Największe podobieństwo genetyczne z sekwencją referencyjną wykazały dwie przewidywane sekwencje genu *SRSF5* dla *Neogale vison*, które tworzą wspólny kład. Sekwencje transkryptów dla gatunków *Neogale vison* i *Mustela lutreola* są bardzo blisko spokrewnione, co sugeruje niedawną dywergencję tych gatunków w kontekście genu *SRSF5*. Z kolei inne gatunki, takie jak *Meles meles* i *Lontra canadensis*, wykazują większe oddalenie na drzewie, co wskazuje na większe zróżnicowanie w obrębie homologów badanego genu.

| | |
|---------------|---|
| Job Title | 0_Ex.1-8 |
| RID | C929DGWS016 Search expires on 08-21 20:16 pm Download All ▾ |
| Program | BLASTN ? Citation ▾ |
| Database | core_nt See details ▾ |
| Query ID | lcl Query_1891945 |
| Description | 0_Ex.1-8 |
| Molecule type | dna |
| Query Length | 1048 |
| Other reports | Distance tree of results MSA viewer ? |

Filter Results

Organism only top 20 will appear exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity to E value to Query Coverage to

[Filter](#) [Reset](#)

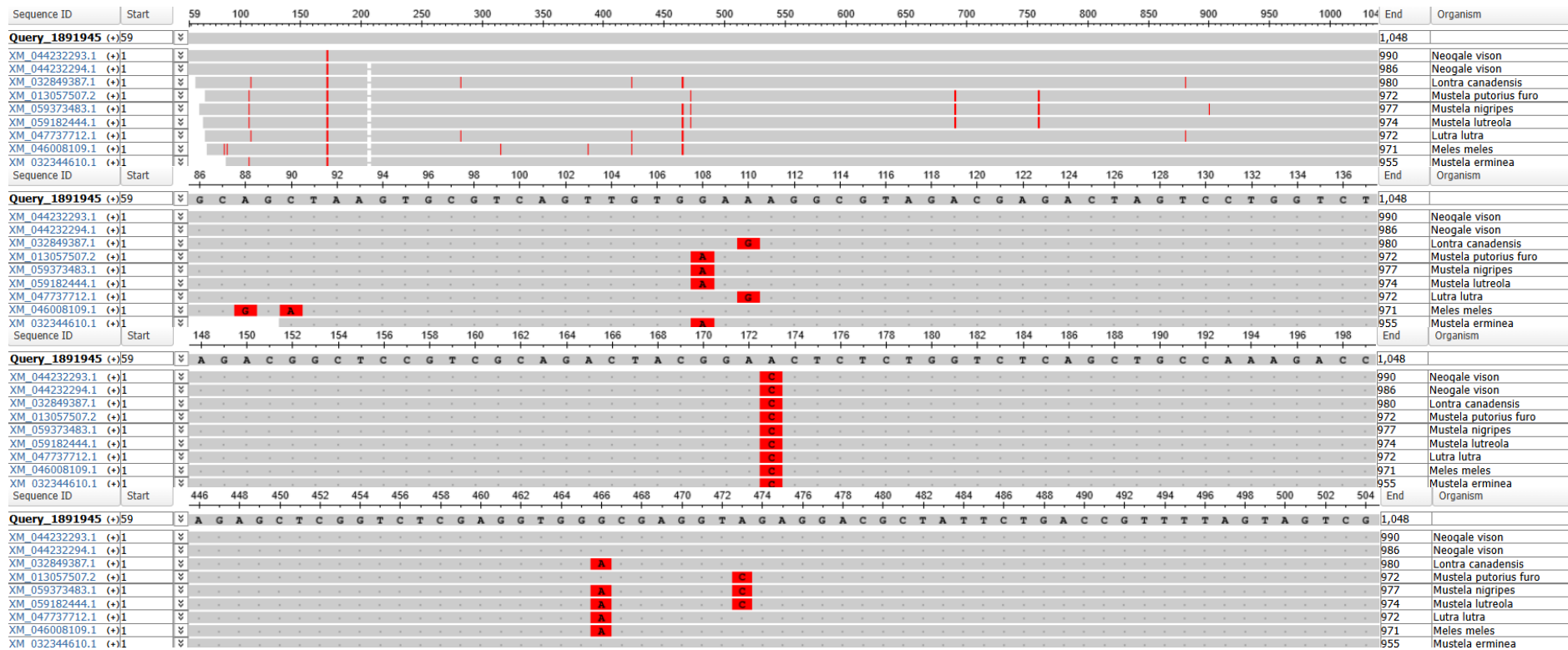
- Descriptions
- Graphic Summary
- Alignments
- Taxonomy

Download ▾ Select columns ▾ Show [?](#)

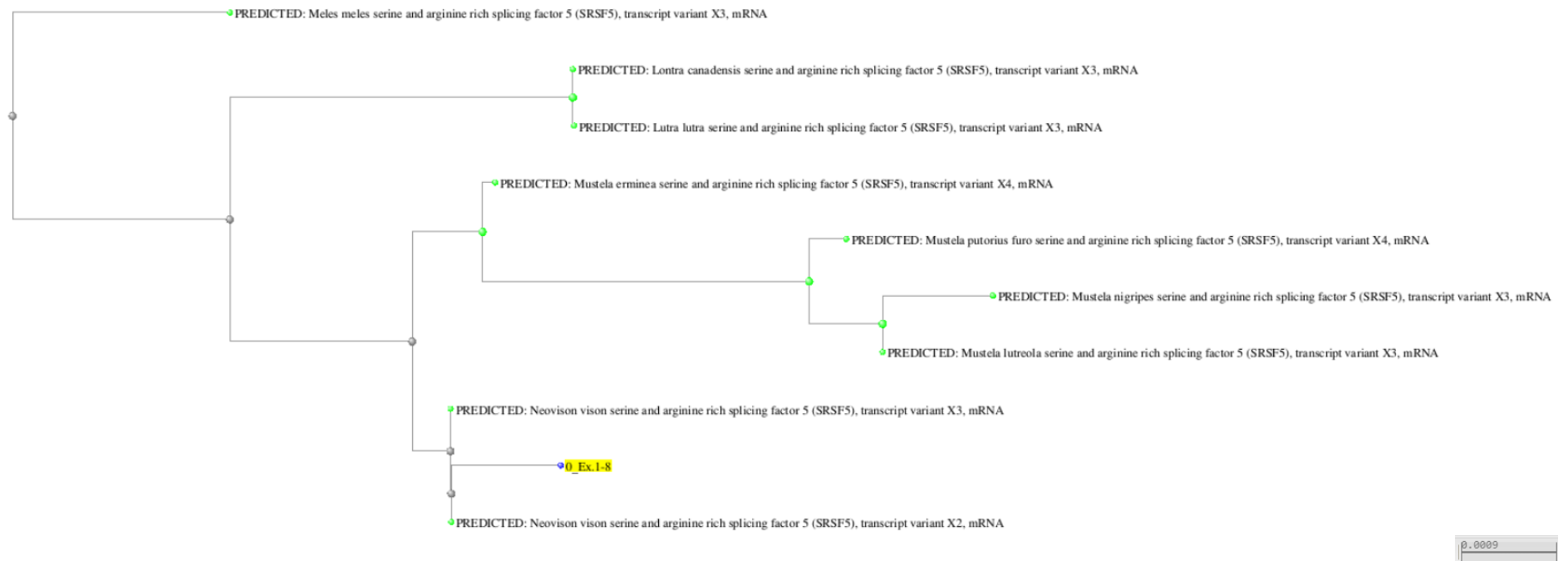
select all 27 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

| | Description | Scientific Name | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len | Accession |
|-------------------------------------|--|-------------------------------------|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------|--------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | PREDICTED: Neovison vison serine and arginine rich splicing factor 5 (SRSF5), transcript variant X2, mRNA | Neogale vison | 1823 | 1823 | 94% | 0.0 | 99.90% | 1006 | XM_044232293.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | PREDICTED: Neovison vison serine and arginine rich splicing factor 5 (SRSF5), transcript variant X3, mRNA | Neogale vison | 1797 | 1797 | 94% | 0.0 | 99.49% | 1002 | XM_044232294.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | PREDICTED: Lontra canadensis serine and arginine rich splicing factor 5 (SRSF5), transcript variant X3, mRNA | Lontra canadensis | 1759 | 1759 | 93% | 0.0 | 98.98% | 1521 | XM_032849387.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | PREDICTED: Mustela putorius furo serine and arginine rich splicing factor 5 (SRSF5), transcript variant X4, mRNA | Mustela putorius... | 1749 | 1749 | 93% | 0.0 | 99.08% | 1514 | XM_013057507.2 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | PREDICTED: Mustela nigripes serine and arginine rich splicing factor 5 (SRSF5), transcript variant X3, mRNA | Mustela nigripes | 1748 | 1748 | 93% | 0.0 | 98.88% | 1517 | XM_059373483.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | PREDICTED: Mustela lutreola serine and arginine rich splicing factor 5 (SRSF5), transcript variant X3, mRNA | Mustela lutreola | 1748 | 1748 | 93% | 0.0 | 98.98% | 1516 | XM_059182444.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | PREDICTED: Lutra lutra serine and arginine rich splicing factor 5 (SRSF5), transcript variant X3, mRNA | Lutra lutra | 1744 | 1744 | 93% | 0.0 | 98.98% | 1515 | XM_047737712.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | PREDICTED: Meles meles serine and arginine rich splicing factor 5 (SRSF5), transcript variant X3, mRNA | Meles meles | 1736 | 1736 | 93% | 0.0 | 98.87% | 1514 | XM_046008109.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | PREDICTED: Mustela erminea serine and arginine rich splicing factor 5 (SRSF5), transcript variant X4, mRNA | Mustela erminea | 1735 | 1735 | 91% | 0.0 | 99.37% | 1500 | XM_032344610.1 |

Ryc. 17. Porównanie sekwencji genu *SRSF5* pobranej z bazy Ensembl z innymi sekwencjami dostępnymi w bazie NCBI wykonane za pomocą aplikacji BLAST.



Ryc. 18. Analiza polimorficznych miejsc genu *SRSF5* w porównaniu z innymi gatunkami z rodziny łasicowatych. Rycina przedstawia wyniki wielokrotnego porównania sekwencji (*Multiple Sequence Alignment, MSA*) uzyskane przy użyciu narzędzia *MSA Viewer* na podstawie algorytmu *BLAST*. Porównanie sekwencji ukazuje konserwatywność i zmienność genetyczną w regionach polimorficznych genu *SRSF5* pomiędzy analizowanymi gatunkami, co umożliwia identyfikację stopnia homologii i ewolucyjnych różnic w rodzinie *Mustelidae*.



Ryc. 19. Drzewo filogenetyczne przedstawiające przewidywane relacje ewolucyjne pomiędzy gatunkami z rodziny *Mustelidae* na podstawie sekwencji genu *SRSF5*. Analizę wykonano metodą Neighbor-Joining (NJ) przy użyciu narzędzia BLAST. Oznaczenie O_Ex.1-8 odnosi się do referencyjnej sekwencji genu *SRSF5* dla norki amerykańskiej (*Neovison vison*), uzyskanej z bazy danych Ensembl. Drzewo filogenetyczne ilustruje stopień pokrewieństwa genetycznego między badanymi gatunkami i umożliwia ocenę homologii oraz różnic ewolucyjnych w obrębie genu *SRSF5* w rodzinie *Mustelidae*.

W celu oceny procentowego podobieństwa sekwencji genu *SRSF5* u sześciu badanych osobników (oznaczonych jako „_Ex 1-8” z numerami od 1 do 6, przy czym osobniki o numerach od 1 do 3 to norki hodowlane, a od 4 do 6 to norki dzikie), wykorzystano narzędzie BLAST. Sekwencja referencyjna, dostępna w bazie Ensembl, posłużyła jako punkt odniesienia do oceny homologii z analizowanymi sekwencjami badanych osobników. Wyniki uzyskane w procesie dopasowania sekwencji przedstawiono na rycinie 20.

Porównywane sekwencje miały długość 1048 nukleotydów, a ich pokrycie względem sekwencji referencyjnej wyniosło 100%, co oznacza, że cała sekwencja referencyjna znalazła swoje dopasowanie w sekwencjach analizowanych osobników. Wartości oczekiwane E dla wszystkich analizowanych sekwencji zbliżały się do zera, co świadczy o wysokiej istotności statystycznej uzyskanych wyników. Analiza pokazała, że sekwencje uzyskane od badanych osobników charakteryzują się bardzo wysokim stopniem zgodności z sekwencją referencyjną, wynoszącym od 99,71% do 100%.

Wszystkie osobniki z grupy nerek dzikich wykazały podobieństwo z referencją na poziomie 100%. W przypadku nerek hodowlanych odnotowano minimalne różnicowanie, gdzie osobnik oznaczony jako 3_Ex.1-8 wykazał najniższy stopień zgodności, wynoszący 99,71%.

Na podstawie analizy z wykorzystaniem narzędzia BLAST określono także miejsca polimorficzne w sekwencji genu *SRSF5* u badanych nerek (rycina 21). W ramach analizy zidentyfikowano trzy zmiany nukleotydowe:

- Transwersję 173A>C- obserwowaną wyłącznie u osobników z grupy hodowlanej (o numerach 1, 2 oraz 3_Ex.1-8)
- Insercję 758ins.T- wykrytą u osobnika z grupy hodowlanej (3_Ex.1-8)
- Transwersję 916G>T- stwierdzoną u osobnika 3_Ex.1-8.

Te zmiany mogą odzwierciedlać różnicowanie genetyczne pomiędzy norkami dzikimi a hodowlanymi.

| | |
|----------------|--|
| Job Title | 0_Ex.1-8 |
| RID | C8X4PXD114 Search expires on 08-21 18:48 pm Download All ▾ |
| Program | Blast 2 sequences Citation ▾ |
| Query ID | lcl Query_5372118 (dna) |
| Query Descr | 0_Ex.1-8 |
| Query Length | 1048 |
| Subject ID | lcl Query_5372120 and 5 more subject(s) (dna) |
| Subject Descr | See details ▾ |
| Subject Length | 6289 |

Filter Results

| | | |
|--|--|--|
| Percent Identity | E value | Query Coverage |
| <input type="text"/> to <input type="text"/> | <input type="text"/> to <input type="text"/> | <input type="text"/> to <input type="text"/> |
| Filter | | Reset |

| | | | |
|---------------------|--|-----------------|------------|
| Descriptions | | Graphic Summary | Alignments |
|---------------------|--|-----------------|------------|

| Sequences producing significant alignments | | | | Download ▾ | Select columns ▾ | Show <input type="text" value="100"/> ▾ | ? | | |
|---|--------------------------|-----------------|--------------------------|--|----------------------------|---|-------------------|----------|---------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> select all | 6 sequences selected | | Graphics | Distance tree of results | MSA Viewer | | | | |
| | Description | Scientific Name | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len | Accession |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 6_Ex.1-8 | | 1936 | 1936 | 100% | 0.0 | 100.00% | 1048 | Query_5372125 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 5_Ex.1-8 | | 1936 | 1936 | 100% | 0.0 | 100.00% | 1048 | Query_5372124 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 4_Ex.1-8 | | 1936 | 1936 | 100% | 0.0 | 100.00% | 1048 | Query_5372123 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 2_Ex.1-8 | | 1930 | 1930 | 100% | 0.0 | 99.90% | 1048 | Query_5372121 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 1_Ex.1-8 | | 1930 | 1930 | 100% | 0.0 | 99.90% | 1048 | Query_5372120 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 3_Ex.1-8 | | 1919 | 1919 | 100% | 0.0 | 99.71% | 1049 | Query_5372122 |

Rycina 20. Porównanie (alignments) sekwencji genu *SRSF5* badanych osobników z sekwencją referencyjną pobraną z bazy Ensembl.

Query range 3: 121 to 180

| | | | |
|---------------|-----|--|-----|
| Query | 121 | GAGACTAGTCCTGGTCTGCGGGGAGGTAGACGGCTCCGTCGCAGACTACGGAACTCTCTG | 180 |
| Query_5372125 | 121 | | 180 |
| Query_5372124 | 121 | | 180 |
| Query_5372123 | 121 | | 180 |
| Query_5372121 | 121 |C..... | 180 |
| Query_5372120 | 121 |C..... | 180 |
| Query_5372122 | 121 |C..... | 180 |

Query range 13: 721 to 780

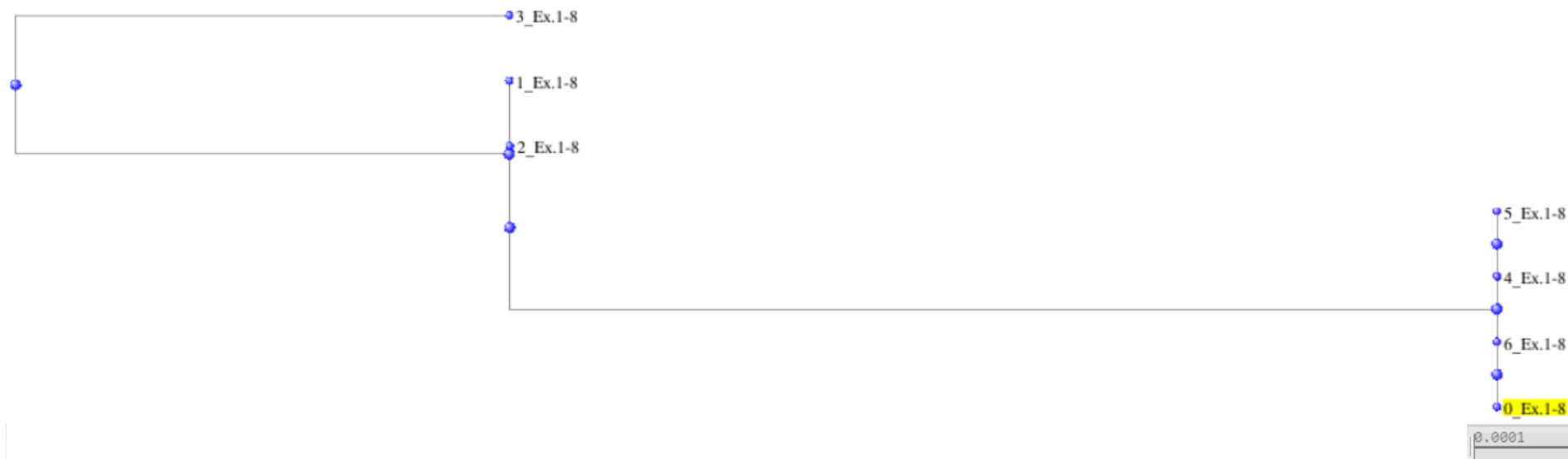
| | | | |
|---------------|-----|--|-----|
| Query | 721 | TTCTGGAAAGGAAATAAATGGGAGAAAAATCAAATTAA-TCGAAGGCAGCAAAAGGCACA | 779 |
| Query_5372125 | 721 | | 779 |
| Query_5372124 | 721 | | 779 |
| Query_5372123 | 721 | | 779 |
| Query_5372121 | 721 | | 779 |
| Query_5372120 | 721 | | 779 |
| Query_5372122 | 721 |T..... | 780 |

Query range 16: 901 to 960

| | | | |
|---------------|-----|--|-----|
| Query | 900 | AGTCCCGTTCTGTTAGTAGGTCTCCTGTGCCTGAGAAGAGCCAGAAACGTGGTTCTTCAA | 959 |
| Query_5372125 | 900 | | 959 |
| Query_5372124 | 900 | | 959 |
| Query_5372123 | 900 | | 959 |
| Query_5372121 | 900 | | 959 |
| Query_5372120 | 900 | | 959 |
| Query_5372122 | 901 |T..... | 960 |

Ryc. 21. Miejsca polimorficzne w obrębie genu *SRSF5*, składającego się z fragmentów zsekwencjonowanych eksonów, które zostały złożone w jeden contig dla poszczególnych osobników z grupy zwierząt hodowlanych. (1_ Ex 1-10 – Query_5372120, 2_ Ex 1-10 – Query_5372121, 3_ Ex 1-10 – Query_5372122) oraz dziko żyjących (4_ Ex 1-10 – Query_5372123, 5_ Ex 1-10 – Query_5372124, 6_ Ex 1-10 – Query_5372125) w porównaniu do sekwencji referencyjnej pobranej z bazy Ensembl (Query- pierwsza linijka w każdym przyrównaniu).

Zebrane dane dotyczące sekwencji genu *SRSF5* zostały poddane analizie filogenetycznej, której rezultaty posłużyły do skonstruowania drzewa filogenetycznego, ilustrującego relacje pokrewieństwa pomiędzy badanymi osobnikami (Ryc. 22). Analiza filogenetyczna wykazała, że osobniki oznaczone numerami 4, 5 i 6_ Ex.1-8, reprezentujące populację nerek dziko żyjących, tworzą wspólny kład z sekwencją referencyjną genu *SRSF5*. Z kolei osobnik oznaczony numerem 3_ Ex.1-8, należący do grupy nerek hodowlanych, wykazał najniższy stopień pokrewieństwa zarówno z sekwencją referencyjną, jak i z pozostałymi analizowanymi sekwencjami, co plasuje go na najbardziej odległej pozycji na drzewie filogenetycznym. Wyniki te wskazują na istotne różnice genetyczne pomiędzy osobnikami dziko żyjącymi a hodowlanymi w zakresie genu *SRSF5*.



Ryc. 22. Drzewo filogenetyczne wygenerowane metodą Neighbor-Joining (NJ) przy użyciu narzędzia BLAST, z maksymalną dopuszczalną różnicą sekwencyjną wynoszącą 0.75 (Max Seq Difference) dla genu *SRSF5*. Sekwencję referencyjną oznaczono jako 0_Ex.1-8. Sekwencje genu *SRSF5* należące do nerek z grupy hodowlanej oznaczono numerami 1_Ex.1-8 do 3_Ex.1-8, natomiast sekwencje nerek dziko żyjących oznaczono numerami od 4_Ex.1-8 do 6_Ex.1-8.

4.5.1. Analiza podobieństwa sekwencji nukleotydowej genu *SRSF5*

W tabeli 15 przedstawiono procentową zgodność sekwencji nukleotydowych genu *SRSF5*. Każda z analizowanych sekwencji (oznaczona jako 0_Ex.1-8, 1_Ex.1-8, itd.) została porównana z pozostałymi sekwencjami, a uzyskane wartości procentowe odzwierciedlają stopień identyczności nukleotydowej pomiędzy nimi. Zaobserwowano wysoką homologię sekwencji nukleotydowych, z większością porównań wykazujących pełną identyczność na poziomie 100%. Sekwencja 3_Ex.1-8 wykazuje najwyższy stopień polimorfizmu, osiągając 99,80% zgodności z innymi analizowanymi sekwencjami. Chociaż różnice te są niewielkie (0,2%), mogą obejmować kluczowe regiony sekwencji kodującej, potencjalnie wpływając na właściwości strukturalne i funkcjonalne białka wynikowego.

Tabela 15. Ocena podobieństwa nukleotydowego [%] genu *SRSF5*, pomiędzy referencją (0_Ex.1-8), osobnikami z grupy nerek fermowych (1_Ex.1-8 – 3_Ex.1-8) i wolno żyjących (4_Ex.1-8 – 6_Ex.1-8).

| Seq-> | 1_Ex.1-8 | 2_Ex.1-8 | 3_Ex.1-8 | 4_Ex.1-8 | 5_Ex.1-8 | 6_Ex.1-8 |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 0_Ex.1-8 | 100 | 100 | 99,8 | 100 | 100 | 100 |
| 1_Ex.1-8 | | 100 | 99,8 | 100 | 100 | 100 |
| 2_Ex.1-8 | | | 99,8 | 100 | 100 | 100 |
| 3_Ex.1-8 | | | | 99,8 | 99,8 | 99,8 |
| 4_Ex.1-8 | | | | | 100 | 100 |
| 5_Ex.1-8 | | | | | | 100 |

Kolor czerwony – podobieństwo z sekwencją referencyjną.

Kolor zielony – podobieństwo w obrębie badanych grup - hodowlanych i dziko żyjących.

Kolor niebieski - podobieństwo pomiędzy grupą fermową i wolno żyjącą.

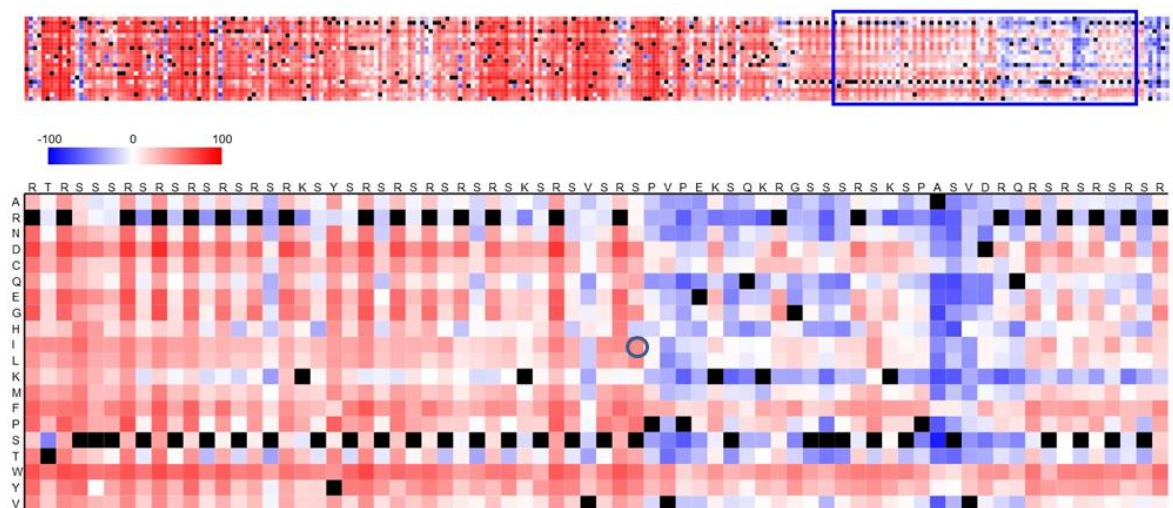
4.5.2. Analiza podobieństwa sekwencji aminokwasowej białka *SRSF5*

W tabeli 16 przedstawiono dane procentowe dotyczące zgodności sekwencji aminokwasowych białka *SRSF5*. Większość porównywanych par sekwencji wykazuje pełną identyczność na poziomie 100, co wskazuje na brak różnic w analizowanych fragmentach. Wyjątek stanowi sekwencja 3_Ex.1-8, która wykazuje niższy poziom zgodności wynoszący 99,6% w porównaniu do pozostałych sekwencji. Sekwencja ta odznacza się odmiennością, z różnicą wynoszącą 0,4%. Chociaż różnica ta może wydawać się niewielka, w kontekście białek nawet pojedyncza substytucja aminokwasowa (mutacja punktowa) może znacząco wpłynąć na strukturę i funkcję białka. Pozostałe sekwencje, z wyjątkiem 3_Ex.1-8, wykazują pełną identyczność, co wskazuje na wysoki stopień konserwatywności tych regionów, typowy dla obszarów białek kluczowych dla ich funkcji, które nie tolerują zmian bez ryzyka utraty aktywności biologicznej.

Mutacja SRSF5 p. S229I jest mutacją missensowną, co oznacza, że zmiana pojedynczego nukleotydu w sekwencji DNA skutkowałą wymianą aminokwasu w łańcuchu białkowym. Taka zmiana może wpływać na właściwości fizykochemiczne białka oraz jego zdolność do pełnienia funkcji biologicznych.

4.5.4. Analiza *in silico* wpływu polimorfizmu p.S229I na funkcjonalność białka SRSF5 z wykorzystaniem macierzy heatmap

Do oceny przewidywanych efektów funkcjonalnych wynikających z substytucji SRSF5 p.S229I wykorzystano zaawansowane narzędzie bioinformatyczne – program SNAP2 (*Screening for Non-Acceptable Polymorphisms 2*). Aplikacja ta umożliwia analizę wpływu konkretnych mutacji aminokwasowych na funkcję białka, bazując na algorytmach maszynowego uczenia oraz informacjach o sekwencji i strukturze białka, co pozwala na precyzyjne prognozowanie potencjalnych zmian w jego aktywności biologicznej.



Ryc. 24. Przewidywanie efektów funkcjonalnych polimorfizmu SRSF5 p. S229I . Heatmapa substytucji aminokwasów w białku SRSF5 została przygotowana w aplikacji SNAP2, przedstawia polimorficzny aminokwas w stosunku do białka referencyjnego.

Na rycinie 24 przedstawiono macierz heatmap, wygenerowaną przez program SNAP2, która obrazuje przewidywane efekty funkcjonalne substytucji aminokwasów w białku SRSF5. Oś pionowa reprezentuje dostępne opcje substytucji, a więc możliwe aminokwasy, które mogą zastąpić natywne reszty. Natomiast oś pozioma przedstawia sekwencję referencyjną białka SRSF5. Dolny panel poniżej głównego panelu jest powiększeniem specyficznego regionu macierzy przedstawionej powyżej i zawartego w niebieskiej ramce.

Kolory i ich natężenie wskazują na przewidywaną siłę efektu danej substytucji: ciemnoczerwony oznacza wysoki wynik (score > 50), co sugeruje silny sygnał wpływu mutacji

na funkcjonalność białka, biały oznacza słaby lub brak sygnału ($-50 < \text{score} < 50$), natomiast niebieski wskazuje niski wynik ($\text{score} < -50$), co oznacza silny sygnał dla neutralności lub braku efektu mutacji. Obszary zaznaczone czarnymi kwadratami reprezentują reszty typu dzikiego lub mutacje synonimiczne.

Analiza wskazuje, że większość potencjalnych substytucji w białku SRSF5 wykazuje wyraźny efekt, co ilustrują liczne ciemnoczerwone obszary. Są one skoncentrowane głównie w regionach, które mogą być krytyczne dla funkcji białka, sugerując, że mutacje w tych miejscach znacząco wpływają na jego działanie. Z kolei niebieskie pola, widoczne szczególnie w regionie C-końcowym białka, sugerują, że substytucje w tych miejscach mają niewielki lub neutralny wpływ na funkcjonalność białka.

Zgodnie z legendą, jasnoczerwone pole na mapie cieplnej sugeruje umiarkowany wpływ substytucji p.S229I w genie *SRSF5* na efekt funkcjonalny białka. Pomimo występowania polimorfizmu w obrębie genu *SRSF5*, zamiana seryny na izoleucynę – aminokwasów o istotnie odmiennych właściwościach fizykochemicznych – nie wykazuje silnego wpływu na funkcję białka.

Analiza *in silico*, uwzględniając aspekty strukturalne i funkcjonalne tej zmiany, określiła wpływ polimorfizmu p.S229I jako umiarkowany, nadając mu punktację równą 46. Wartość ta sugeruje, że ten polimorfizm wykazuje pewien poziom wpływu na zmianę funkcjonalności białka, co może przekładać się na zmiany w mechanizmach splicingu. W kontekście potencjalnych konsekwencji strukturalnych, zamiana seryny na izoleucynę, będąca zamianą hydrofilowej reszty aminokwasowej na hydrofobową, może wpływać na lokalne właściwości strukturalne białka, a wynik 46 sugeruje, że ta zmiana może być znacząca, ale nie drastyczna. Jeśli *SRSF5* jest zaangażowany w procesy nowotworowe lub inne schorzenia związane z aberracyjnym splicingiem, wynik 46 może sugerować, że polimorfizm p.S229I może być czynnikiem ryzyka modyfikującym fenotyp choroby.

4.6. Polimorfizm sekwencji genu *RNF165* (*ARK2C*)

Polimorfizm sekwencji genu *RNF165* uzyskanej z bazy danych Ensembl w odniesieniu do innych sekwencji zdeponowanych w bazie NCBI został oceniony przy użyciu algorytmu BLASTN (ang. *Basic Local Alignment Search Tool for Nucleotides*). Do analizy zastosowano bazę zapytania 'core_nt', a długość zapytania wynosiła 1044 nukleotydy. Wyniki porównania zostały przedstawione na rycinie 25. Przy zawężeniu progu podobieństwa do 98, zaobserwowano, że w wynikach pozostały wyłącznie sekwencje ssaków należących do rodziny łasicowatych (*Mustelidae*) oraz jeden gatunek z rodziny fokowatych (*Phocidae*). Wśród zidentyfikowanych gatunków znajdowały się: gronostaj europejski *Mustela erminea*, tchórz czarnołapy *Mustela nigripes*, fretka domowa *Mustela putorius furo*, norka europejska *Mustela lutreola*, wydra kanadyjska *Lontra canadensis*, wydra europejska *Lutra*, , borsuk europejski *Meles*, wydra morska *Enhydra lutris kenyoni* oraz jeden przedstawiciel rodziny fokowatych (*Phocidae*) foka szara *Halichoerus grypus*. Najwyższy stopień homologii, wynoszący 100, uzyskano dla przewidywanej sekwencji genu *RNF165* u norki amerykańskiej *Neovison vison*, zdeponowanej pod numerem akcesyjnym XM_044244389.1. Maksymalny wynik (Max Score) wynosił 1685, co potwierdza wysoką homologiczność. Sekwencje homologiczne genu *SRSF5* u gatunków z rodzaju *Mustela* wykazywały zgodność powyżej 99% z referencyjną sekwencją oraz bliskie zero wartościami E (E value), co wskazuje na istotność porównywanych sekwencji. Wyniki sugerują, że badana sekwencja genu *RNF165* jest wysoce konserwatywna w obrębie rodziny łasicowatych.

Na podstawie analizy z wykorzystaniem narzędzia MSA Viewer określono polimorfizm molekularny genu *RNF165*, którego sekwencja została pobrana z bazy Ensembl, względem innych sekwencji zdeponowanych w bazie NCBI (rycina 26). Na uwagę zasługuje fakt, iż wśród przyrównywanych fragmentów DNA nie ma danych otrzymanych doświadczalnie na podstawie sekwencjonowania a jedynie przewidywane za pomocą algorytmów bioinformatycznych. W porównaniu do pozostałych gatunków z rodziny łasicowatych zidentyfikowano cztery miejsca polimorficzne, w tym:

- trzy mutacje typu tranzycji: 486T>C, 654A>G, 687T>C,
- oraz jedną mutację typu transwersji: 771A>T/C.

Polimorfizmy te mogą odgrywać ważną rolę w dalszych badaniach nad zmiennością genetyczną w obrębie rodziny *Mustelidae*, sugerując potencjalne różnice funkcjonalne lub strukturalne w obrębie genu *RNF165*, a także mogą służyć do identyfikacji gatunkowej *Neogale vison*.

| | |
|---------------|---|
| Job Title | 0_Ex.1-8 |
| Job ID | C91JVF74013 Search expires on 08-21 20:04 pm Download All ▾ |
| Program | BLASTN ? Citation ▾ |
| Database | core_nt See details ▾ |
| Query ID | lcl Query_1678427 |
| Description | 0_Ex.1-8 |
| Molecule type | dna |
| Query Length | 1044 |
| Other reports | Distance tree of results MSA viewer ? |

Filter Results

Organism only top 20 will appear exclude

[+ Add organism](#)

Percent Identity: to

E value: to

Query Coverage: to

- Descriptions
- Graphic Summary
- Alignments
- Taxonomy

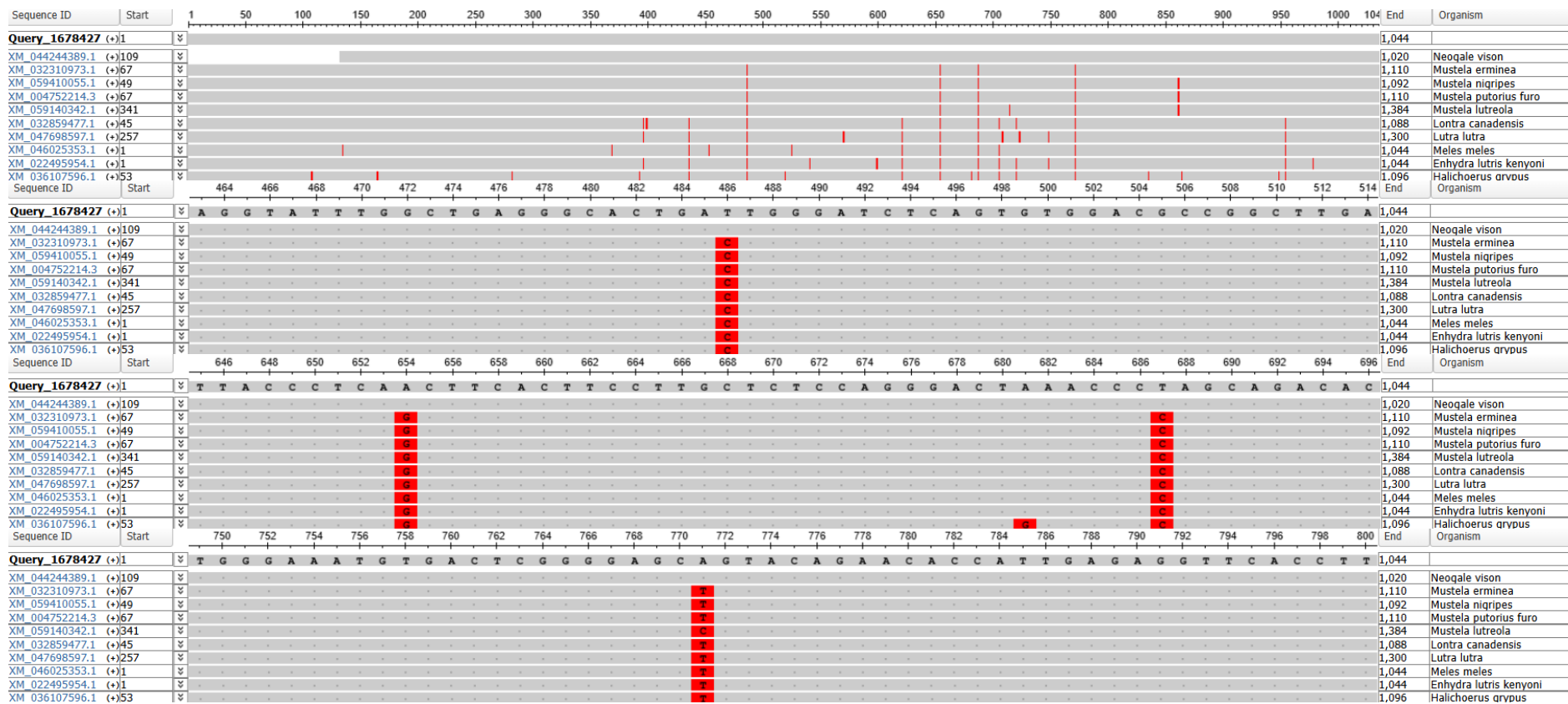
Sequences producing significant alignments

Download ▾ Select columns ▾ Show [?](#)

select all 10 sequences selected

[GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

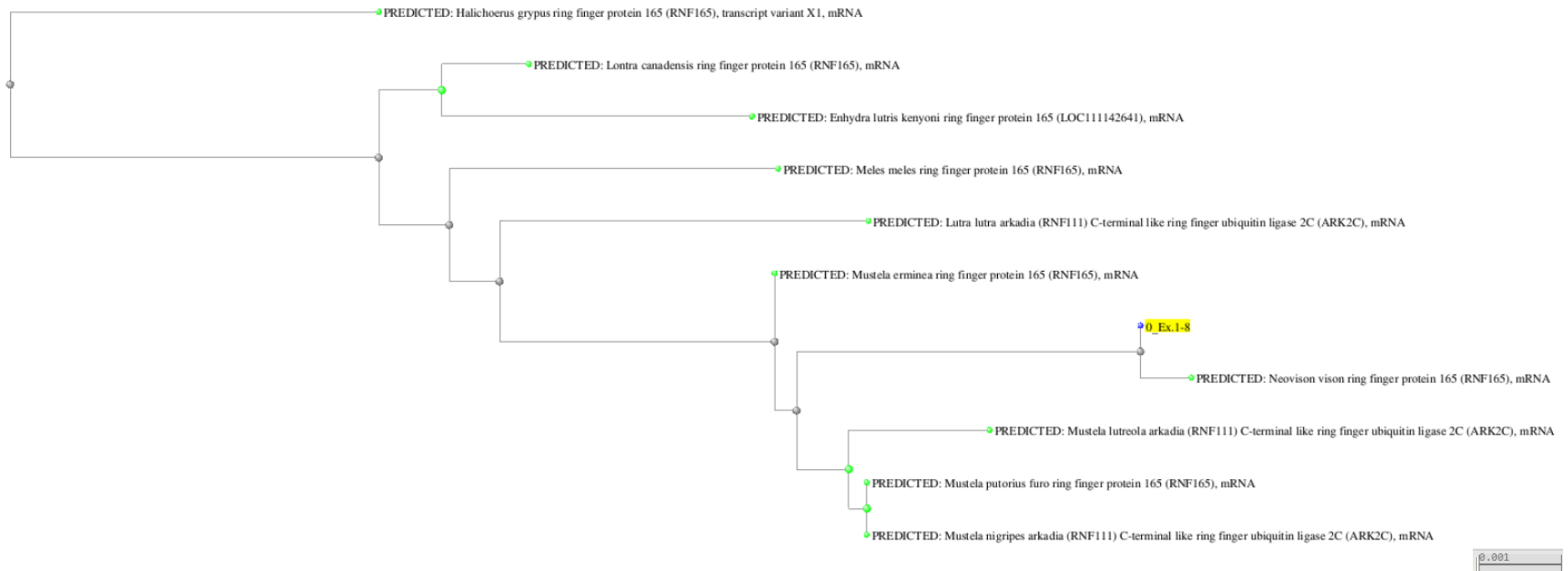
| | Description | Scientific Name | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len | Accession |
|-------------------------------------|--|--------------------------------------|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------|--------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | PREDICTED: Neovison vison ring finger protein 165 (RNF165), mRNA | Neogale vison | 1685 | 1685 | 87% | 0.0 | 100.00% | 1609 | XM_044244389.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | PREDICTED: Mustela erminea ring finger protein 165 (RNF165), mRNA | Mustela erminea | 1906 | 1906 | 100% | 0.0 | 99.62% | 1738 | XM_032310973.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | PREDICTED: Mustela nigripes arkadia (RNF111) C-terminal like ring finger ubiquitin ligase 2C (ARK2C), mRNA | Mustela nigripes | 1901 | 1901 | 100% | 0.0 | 99.52% | 1694 | XM_059410055.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | PREDICTED: Mustela putorius furo ring finger protein 165 (RNF165), mRNA | Mustela putorius... | 1901 | 1901 | 100% | 0.0 | 99.52% | 1729 | XM_004752214.3 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | PREDICTED: Mustela lutreola arkadia (RNF111) C-terminal like ring finger ubiquitin ligase 2C (ARK2C), mRNA | Mustela lutreola | 1895 | 1895 | 100% | 0.0 | 99.43% | 2024 | XM_059140342.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | PREDICTED: Lontra canadensis ring finger protein 165 (RNF165), mRNA | Lontra canadensis | 1868 | 1868 | 100% | 0.0 | 98.95% | 1698 | XM_032859477.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | PREDICTED: Lutra lutra arkadia (RNF111) C-terminal like ring finger ubiquitin ligase 2C (ARK2C), mRNA | Lutra lutra | 1862 | 1862 | 100% | 0.0 | 98.85% | 1891 | XM_047698597.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | PREDICTED: Meles meles ring finger protein 165 (RNF165), mRNA | Meles meles | 1862 | 1862 | 100% | 0.0 | 98.85% | 1654 | XM_046025353.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | PREDICTED: Enhydra lutris kenyonii ring finger protein 165 (LOC111142641), mRNA | Enhydra lutris ke... | 1851 | 1851 | 100% | 0.0 | 98.66% | 1660 | XM_022495954.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | PREDICTED: Halichoerus grypus ring finger protein 165 (RNF165), transcript variant X1, mRNA | Halichoerus gry... | 1829 | 1829 | 100% | 0.0 | 98.28% | 5449 | XM_036107596.1 |



Ryc. 26. Miejsca polimorficzne genu *RNF165* względem sekwencji innych gatunków zdeponowanych w bazie NCBI.

Na podstawie porównania za pomocą BLASTN sekwencji referencyjnej genu *RNF165* z sekwencjami zdeponowanymi w bazie danych NCBI skonstruowano drzewo filogenetyczne, przedstawione na rycinie 27. Filogram, wykonany metodą Neighbor Joining, ilustruje relacje ewolucyjne pomiędzy różnymi gatunkami z rodziny *Mustelidae* oraz jednym z rodziny *Phocidae*, bazując na sekwencjach genu *RNF165*. Największe podobieństwo genetyczne do sekwencji referencyjnej 0_Ex.1-8 wykazała przewidywana sekwencja genu *RNF165* dla gatunku *Neogale vison* (norka amerykańska), co potwierdza ich zgrupowanie w tym samym kładzie na drzewie filogenetycznym. Bliskość filogenetyczna tych sekwencji wynika z ich identyczności, ocenionej na poziomie 100 przy użyciu algorytmu BLAST, co wskazuje na pełną zgodność sekwencji nukleotydowych. Niewielka odległość filogenetyczna między sekwencją referencyjną a innymi gatunkami z rodzaju *Mustela*, takimi jak *Mustela erminea* (gronostaj europejski), *Mustela putorius furo* (fretka domowa), *Mustela lutreola* (norka europejska), *Mustela nigripes* (tchórz czarnołapy) wskazuje na wysokie podobieństwo tych sekwencji, co może wynikać z niedawnej dywergencji ewolucyjnej w kontekście genu *RNF165*.

Z kolei inne gatunki należące do rodziny *Mustelidae*, jak np. *Meles meles* (borsuk europejski) i *Lutra lutra* (wydra europejska), wykazują większe odległości filogenetyczne w analizie tego genu względem sekwencji referencyjnej, co może wskazywać na wcześniejszą dywergencję ewolucyjną tej części genomu. Ciekawą obserwacją jest bliskie pokrewieństwo sekwencji genu *RNF165* u gatunków morskich, takich jak *Halichoerus grypus* (foka szara) i *Lontra canadensis* (wydra kanadyjska), co może sugerować zachowanie konserwatywnej sekwencji genu u organizmów żyjących w środowiskach wodnych. Wyniki te wskazują, że gen *RNF165* może podlegać różnym presjom selekcyjnym w zależności od niszy ekologicznej, co przekłada się na zróżnicowanie międzygatunkowe w jego sekwencji.



Ryc.27. Drzewo filogenetyczne ilustrujące przewidywane relacje ewolucyjne pomiędzy gatunkami z rodziny *Mustelidae*, na oparte na analizie sekwencji genu *RNF165*. Do zobrazowania relacji filogenetycznych wykonano drzewo metodą Neighbor-Joining (NJ) przy użyciu narzędzia BLAST. Oznaczenie O_Ex.1-8 odnosi się do sekwencji referencyjnej genu *RNF165* dla norki amerykańskiej (*Neogale vison*), uzyskanej z bazy danych Ensembl.

| | |
|----------------|---|
| Job Title | 0_Ex.1-8 |
| RID | C8SM3X1H114 Search expires on 08-21 17:31 pm Download All ▾ |
| Program | Blast 2 sequences Citation ▾ |
| Query ID | lcl Query_8202380 (dna) |
| Query Descr | 0_Ex.1-8 |
| Query Length | 1044 |
| Subject ID | lcl Query_8202382 and 5 more subject(s) (dna) |
| Subject Descr | See details ▾ |
| Subject Length | 6264 |

Filter Results

| | | |
|--|--|--|
| Percent Identity | E value | Query Coverage |
| <input type="text"/> to <input type="text"/> | <input type="text"/> to <input type="text"/> | <input type="text"/> to <input type="text"/> |
| Filter | | Reset |

- Descriptions
- Graphic Summary
- Alignments

Sequences producing significant alignments

Download ▾ Select columns ▾ Show [?](#)

select all 6 sequences selected

[Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

| | Description | Scientific Name | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len | Accession |
|-------------------------------------|--------------------------|-----------------|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------|---------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | 6_Ex.1-8 | | 1923 | 1923 | 100% | 0.0 | 99.90% | 1044 | Query_8202387 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 5_Ex.1-8 | | 1923 | 1923 | 100% | 0.0 | 99.90% | 1044 | Query_8202386 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 3_Ex.1-8 | | 1923 | 1923 | 100% | 0.0 | 99.90% | 1044 | Query_8202384 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 4_Ex.1-8 | | 1917 | 1917 | 100% | 0.0 | 99.81% | 1044 | Query_8202385 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 2_Ex.1-8 | | 1917 | 1917 | 100% | 0.0 | 99.81% | 1044 | Query_8202383 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 1_Ex.1-8 | | 1917 | 1917 | 100% | 0.0 | 99.81% | 1044 | Query_8202382 |

Ryc. 28. Porównanie (alignments) sekwencji genu *RNFI65* badanych osobników z sekwencją referencyjną pobraną z bazy Ensembl.

W celu oceny procentowego podobieństwa sekwencji genu *RNF165* u sześciu badanych nerek (oznaczonych jako „_Ex 1-8” z numerami od 1 do 6, przy czym osobniki o numerach od 1 do 3 to norki hodowlane, a od 4 do 6 to norki dzikie), wykorzystano narzędzie BLAST. Punktem odniesienia w analizie była sekwencja referencyjna, pobrana z bazy Ensembl. Wyniki uzyskane w procesie dopasowania sekwencji przedstawiono na rycinie 28. Porównywane sekwencje miały długość 1044 nukleotydów. Cała sekwencja referencyjna znalazła swoje dopasowanie w sekwencjach analizowanych osobników, o czym świadczy pokrycie (Query Cover) wynoszące 100. Wartości oczekiwane E dla wszystkich analizowanych sekwencji zbliżyły się do zera, co wskazuje na wysoką istotność statystyczną wyników. Analiza ujawniła, iż sekwencje uzyskane od badanych osobników charakteryzują się bardzo wysokim stopniem zgodności z sekwencją referencyjną, wynoszącym od 99,81 (dla osobników 1, 2, 4_Ex.1-8) do 99,90 (dla osobników 3, 5, 6_Ex.1-8). Od średniego wyniku dla grupy nerek hodowlanych wyraźnie odróżniała się sekwencja osobnika 3_Ex.1-8, zaś dla grupy nerek dziko żyjących 4_Ex.1-8.

Wykorzystując narzędzie BLAST określono także miejsca polimorficzne w sekwencji genu *RNF165* u badanych nerek (rycina 29). W ramach analizy zidentyfikowano dwa polimorfizmy nukleotydowe:

- Tranzycję 141A>G - stwierdzoną u osobników 1, 2 oraz 4_Ex.1-8.
- Tranzycję 596A>G - obserwowaną u wszystkich badanych osobników.

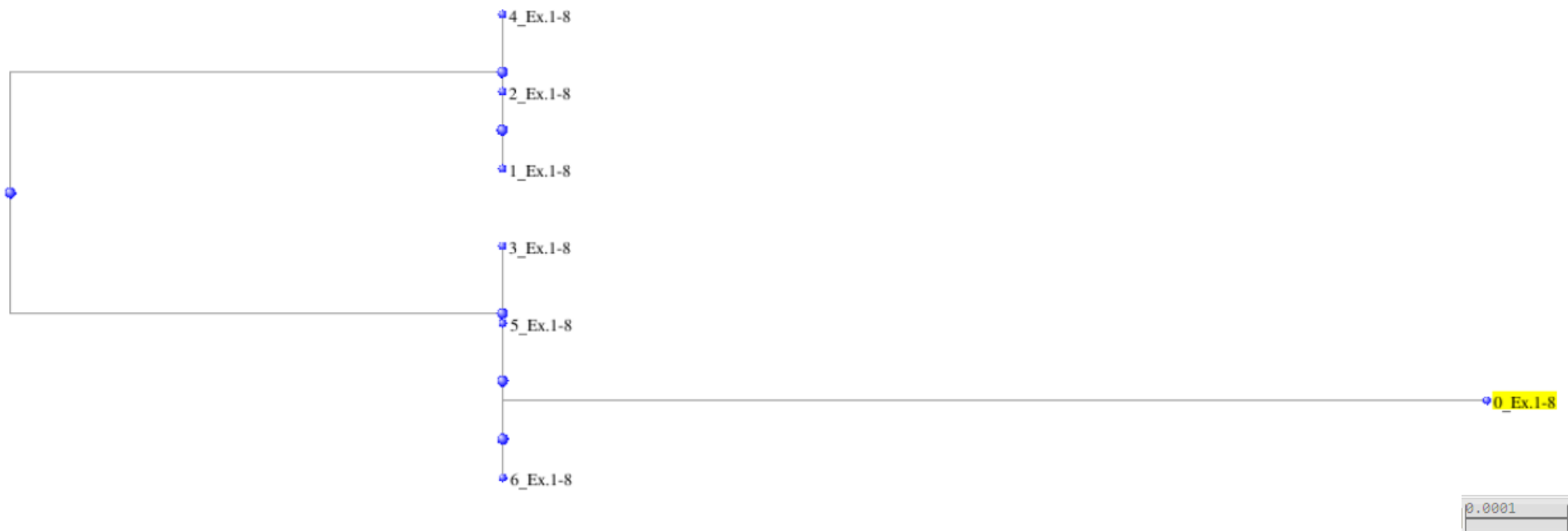
Zmiany te mogą mieć potencjalne znaczenie funkcjonalne i wymagają dalszej analizy w kontekście ich wpływu na strukturę i funkcję białka kodowanego przez gen *RNF165*.

```
Query range 3: 121 to 180
Query      121  GGCCCCCGCAGCCGAGCAGCTGGCGCCCGACTTCCCCCTGGCCACCCCGTGCACTCG  180
Query_8202387 121  .....A.....  180
Query_8202386 121  .....A.....  180
Query_8202384 121  .....A.....  180
Query_8202385 121  .....A.....  180
Query_8202383 121  .....A.....  180
Query_8202382 121  .....A.....  180
```

```
Query range 10: 541 to 600
Query      541  ATCCCTCAGCACTATCAGCATTACCTAGCGACTCCTCGAATGCACCACCTTCCCAGAAAC  600
Query_8202387 541  .....A.....  600
Query_8202386 541  .....A.....  600
Query_8202384 541  .....A.....  600
Query_8202385 541  .....A.....  600
Query_8202383 541  .....A.....  600
Query_8202382 541  .....A.....  600
```

Ryc. 29. Miejsca polimorficzne w obrębie genu *RNF165* złożonego z fragmentów zsekwencjonowanych eksonów i złożonych w jeden contig dla poszczególnych osobników należących do grupy zwierząt hodowlanych (1_Ex 1-8 – Query_8202382, 2_Ex 1-8 – Query_8202383, 3_Ex 1-8 – Query_8202384) oraz dziko żyjących (4_Ex 1-8 – Query_8202385, 5_Ex 1-8 – Query_8202386, 6_Ex 1-8 – Query_8202387) w porównaniu do sekwencji referencyjnej pobranej z bazy Ensembl (Query – pierwsza linijka w każdym przyrównaniu).

Dane dotyczące sekwencji genu *RNF165* zostały poddane analizie filogenetycznej, której rezultaty posłużyły do skonstruowania metodą Neighbor Joining drzewa, ilustrującego relacje pokrewieństwa genetycznego pomiędzy sześcioma badanymi sekwencjami (oznaczonymi od 1_Ex.1-8 do 6_Ex.1-8) oraz ich odległości filogenetycznej od sekwencji referencyjnej (0_Ex.1-8) (Ryc. 30). Uzyskane drzewo filogenetyczne składa się z dwóch nierozgałęzionych kładów. Jeden z nich zawiera sekwencję referencyjną. Zajmuje ona peryferyjne położone miejsce w stosunku do pozostałych trzech sekwencji, tworzących z nią wspólny kład, a więc 3_Ex.1-8, 5_Ex.1-8 oraz 6_Ex.1-8. Sekwencje te były zlokalizowane w podobnej odległości od sekwencji referencyjnej, co wskazuje na brak wyraźnych różnic genetycznych między nimi. Drugi oddzielny kład tworzą sekwencje dwóch nerek hodowlanych: 1_Ex.1-8, 2_Ex.1-8 oraz jednej dzikiej 4_Ex.1-8. Wyniki wskazują na pewien stopień zróżnicowania genetycznego pomiędzy analizowanymi sekwencjami, przy jednoczesnym zachowaniu wysokiego podobieństwa w obrębie głównego kładu, do którego należy sekwencja referencyjna.



Ryc. 30. Drzewo filogenetyczne wygenerowane metodą Neighbor-Joining (NJ) przy użyciu narzędzia BLAST, z maksymalną dopuszczalną różnicą sekwencyjną wynoszącą 0.75 (Max Seq Difference) dla genu *RNF165*. Sekwencję referencyjną oznaczono jako 0_Ex.1-8. Sekwencje genu *RNF165* należące do nerek z grupy hodowlanej oznaczono numerami 1_Ex.1-8 do 3_Ex.1-8, natomiast sekwencje nerek dziko żyjących oznaczono numerami od 4_Ex.1-8 do 6_Ex.1-8.

4.6.1. Analiza podobieństwa sekwencji nukleotydowej genu *RNF165*

W tabeli 17. przedstawiono procentową zgodność sekwencji nukleotydowych genu *RNF165*. Każda z analizowanych sekwencji (oznaczona jako 0_Ex.1-8, 1_Ex.1-8, itd.) została porównana z pozostałymi sekwencjami, a uzyskane wartości procentowe odzwierciedlają stopień identyczności nukleotydowej pomiędzy nimi. Zaobserwowano wysoką homologię sekwencji nukleotydowych, z większością porównań wykazujących identyczność na poziomie od 99,8 do 100%. Sekwencje 3, 5 i 6_Ex.1-8 wykazały najwyższy poziom podobieństwa z sekwencją referencyjną, wynoszący 99,9%, co sugeruje, że są one najbardziej zbliżone do referencyjnej sekwencji genu *RNF165*. Pozostałe osobniki (1, 2 i 4_Ex.1-8) wykazały podobieństwo na poziomie 99,8% względem sekwencji referencyjnej, co również potwierdza wysoki stopień identyczności genetycznej. Ogólnie, wysoki procent podobieństwa nukleotydowego genu *RNF165* między badanymi osobnikami oraz względem sekwencji referencyjnej wskazuje na silną konserwatywność tej sekwencji genetycznej w badanych grupach zwierząt hodowlanych i dziko żyjących. Tego rodzaju konserwatywność może sugerować, że gen *RNF165* pełni istotne funkcje biologiczne, gdzie nawet niewielkie zmiany w sekwencji mogą być negatywnie selekcyjonowane.

Tabela 17. Ocena podobieństwa nukleotydowego [%] genu *RNF165*, pomiędzy referencją (0_Ex.1-8), osobnikami z grupy nerek fermowych (1_Ex.1-8 – 3_Ex.1-8) i wolno żyjących (4_Ex.1-8 – 6_Ex.1-8).

| Seq-> | 1 Ex.1-8 | 2 Ex.1-8 | 3 Ex.1-8 | 4 Ex.1-8 | 5 Ex.1-8 | 6 Ex.1-8 |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 0_Ex.1-8 | 99,8 | 99,8 | 99,9 | 99,8 | 99,9 | 99,9 |
| 1_Ex.1-8 | | 100 | 99,9 | 100 | 99,9 | 99,9 |
| 2_Ex.1-8 | | | 99,9 | 100 | 99,9 | 99,9 |
| 3_Ex.1-8 | | | | 99,9 | 100 | 100 |
| 4_Ex.1-8 | | | | | 99,9 | 99,9 |
| 5_Ex.1-8 | | | | | | 100 |

Kolor czerwony – podobieństwo z sekwencją referencyjną.

Kolor zielony – podobieństwo w obrębie badanych grup - hodowlanych i dziko żyjących.

Kolor niebieski- podobieństwo pomiędzy grupą fermową i wolno żyjącą.

4.6.2. Analiza podobieństwa sekwencji aminokwasowej białka RNF165

W tabeli 18. przedstawiono dane procentowe dotyczące zgodności sekwencji aminokwasowych białka RNF165. Analiza podobieństwa aminokwasowego białka RNF165 między sekwencjami badanych osobników (1_Ex.1-8-6_Ex.1-8) a sekwencją referencyjną (0_Ex.1-8) została przeprowadzona w celu oceny stopnia konserwatywności. Wyniki analizy przedstawiono w formie macierzy procentowej identyczności aminokwasowej. Uzyskane wyniki wskazują na bardzo wysoki stopień podobieństwa aminokwasowego białka RNF165 zarówno pomiędzy sekwencją referencyjną a badanymi osobnikami, jak i pomiędzy samymi

badanymi osobnikami. Podobieństwo aminokwasowe pomiędzy sekwencją referencyjną (0_Ex.1-8) a każdym z analizowanych osobników wynosi 99,70. Oznacza to, że białko RNF165 jest wysoce konserwatywne.

W przypadku badanych osobników (1_Ex.1-8 - 6_Ex.1-8) zaobserwowano pełną identyczność (100%) sekwencji aminokwasowych, a więc brak różnic strukturalnych białka RNF165 pomiędzy osobnikami hodowlanymi a dziko żyjącymi. Otrzymane wyniki wskazują, że sekwencja aminokwasowa białka RNF165 jest wysoce konserwatywna wśród nerek wybranych do badań. Wysoka konserwatywność sekwencji aminokwasowej białka RNF165 może sugerować, że białko to pełni istotne funkcje biologiczne.

Tabela 18. Ocena podobieństwa sekwencji aminokwasowej białka RNF165, pomiędzy referencją (0_Ex.1-8), osobnikami z grupy nerek fermowych (1_Ex.1-8 – 3_Ex.1-8) i wolno żyjących (4_Ex.1-8 – 6_Ex.1-8).

| Seq-> | 1 Ex.1-8 | 2 Ex.1-8 | 3 Ex.1-8 | 4 Ex.1-8 | 5 Ex.1-8 | 6 Ex.1-8 |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 0_Ex.1-8 | 99,7 | 99,7 | 99,7 | 99,7 | 99,7 | 99,7 |
| 1_Ex.1-8 | | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 2_Ex.1-8 | | | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 3_Ex.1-8 | | | | 100 | 100 | 100 |
| 4_Ex.1-8 | | | | | 100 | 100 |
| 5_Ex.1-8 | | | | | | 100 |

Kolor czerwony – podobieństwo z sekwencją referencyjną.

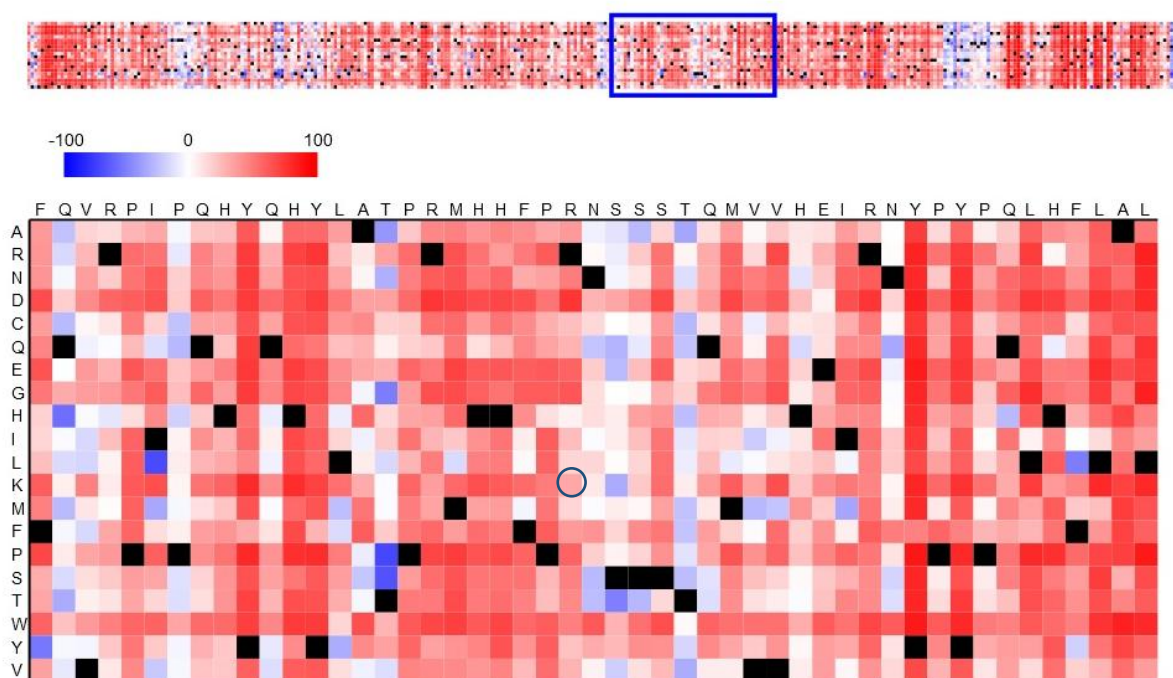
Kolor zielony – podobieństwo w obrębie badanych grup - hodowlanych i dziko żyjących.

Kolor niebieski- podobieństwo pomiędzy grupą fermową i wolno żyjącą.

4.6.3. Porównanie sekwencji aminokwasowych białka będącego produktem ekspresji genu *RNF165*

Białko RNF165 (ang. *ring finger protein 165*) jest to ligaza ubikwitynowo-białkowa E3 ARK2C, a więc białko pełniące funkcje enzymatyczne w komórkach eukariotycznych. Sekwencje aminokwasowe zostały wyrównane przy użyciu algorytmu Mega 11. Rycina 31 przedstawia porównanie fragmentu sekwencji aminokwasowych białka RNF165 u sześciu badanych osobników (oznaczonych numerami od 1 do 6) w odniesieniu do sekwencji referencyjnej (oznaczonej numerem 0). Dopasowanie całej sekwencji aminokwasowej białka RNF165 zamieszczono w załącznik 2. Sekwencja białka wykazuje znaczną konserwatywność. Wyjątek stanowi pozycja 199, w której u wszystkich badanych osobników (zarówno pochodzących z grupy nerek hodowlanych, jak i dziko żyjących) odnotowano substytucję argininy (R) na lizynę (K). Mutacja RNF165 p.R199K jest mutacją zmiany sensu, co oznacza, że substytucja pojedynczego nukleotydu w DNA prowadzi do zmiany aminokwasu w sekwencji białka. Jeżeli aminokwas jest zastępowany przez inny aminokwas o zbliżonych właściwościach

polarnymi. Ze względu na zasadowy charakter bocznego łańcucha, punkt izoelektryczny (pI) argininy jest stosunkowo wysoki w porównaniu do innych aminokwasów i wynosi 10,76. Oznacza to, że przy tym pH arginina występuje w formie obojętnej. Lizyna (Lys, K) jest jednym z podstawowych aminokwasów, którego łańcuch boczny zakończony jest grupą aminową, co nadaje mu zasadowy charakter. W warunkach fizjologicznych lizyna jest naładowana dodatnio ze względu na przyłączanie protonów do grupy aminowej. Lizyna, podobnie jak arginina, jest aminokwasem polarnym, dobrze rozpuszczalnym w wodzie, zdolnym do tworzenia wiązań wodorowych oraz oddziaływań elektrostatycznych. Lizyna ma punkt izoelektryczny (pI) wynoszący 9,74.



Ryc. 32. Przewidywanie efektów funkcjonalnych polimorfizmu RNF165 p. R199K. Heatmapa substytucji aminokwasów w białku RNF165 została przygotowana w aplikacji SNAP2, przedstawia polimorficzny aminokwas w stosunku do białka referencyjnego.

Zarówno arginina, jak i lizyna wykazują zbliżone właściwości fizykochemiczne, charakteryzując się zasadowymi łańcuchami bocznymi o dodatnim ładunku. Oba aminokwasy posiadają grupy funkcyjne, które w warunkach fizjologicznych są protonowane, co nadaje im zdolność do tworzenia silnych oddziaływań elektrostatycznych. Ponadto, zbliżone wartości punktów izoelektrycznych (pI) obu aminokwasów wskazują na podobne zachowanie w zmiennych warunkach pH. Podobnymi właściwościami fizykochemicznymi aminokwasów możemy wytłumaczyć fakt, iż pomimo zmiany nukleotydu, a następnie zmiany aminokwasu wpływ tego polimorfizmu na funkcjonalność białka RNF165 jest niski w badaniu *in silico*.

4.7. Polimorfizm sekwencji genu *SKOR2*

Polimorfizm sekwencji genu *SKOR2* (*SKI family transcriptional corepressor 2*) pobranej z bazy Ensembl (o identyfikatorze ENSNVIG00000001287.1) został oceniony względem innych sekwencji tego genu zdeponowanych w bazie NCBI. Analizę wykonano przy użyciu algorytmu BLASTN. Zastosowano bazę zapytania 'core_nt', a długość zapytania wynosiła 3031 nukleotydów. Wyniki analizy BLASTN dla sekwencji referencyjnej przedstawiające listę homologicznych sekwencji u różnych gatunków zwierząt wraz z parametrami porównania, takimi jak zgodność procentowa, wartość E, maksymalny wynik, pokrycie zapytania, zamieszczono na rycinie 32. Po zawężeniu procentu podobieństwa do 98%, wśród wyników pozostały wyłącznie sekwencje ssaków należących do rodziny łąsicowatych (*Mustelidae*). Najwyższa zgodność (99,67%) została uzyskana dla przewidywanej sekwencji genu *SKOR2* u *Neovison vison* (zdeponowaną pod numerem akcesyjnym XM_044240987.1) z maksymalnym wynikiem (Max Score) wynoszącym 5544. Na drugim miejscu pod względem podobieństwa z wynikiem 98,35% uplasowały się dwa warianty transkrypcyjne X1 oraz X2 genu *SKOR2* u gatunku tchórz czarnołapy *Mustela nigripes*. Natomiast na trzecim miejscu pod względem podobieństwa z wynikiem 98,32% znalazły się dwa warianty transkrypcyjne X1 oraz X2 genu *SKOR2* u gatunku norka europejska *Mustela lutreola*. Pozostałe sekwencje homologów genu *SKOR2*, u takich gatunków jak fretka domowa *Mustela putorius furo*, borsuk europejski *Meles meles*, czy wydra europejska *Lutra lutra*, również wykazywały wysoką zgodność - powyżej 98%. Wśród wyników wyszukiwania pojawiły się także: przewidywana sekwencja genu *SKOR2* u wydry morskiej *Enhydra lutris kenyonii* z podobieństwem równym 98,15% oraz fragment chromosomu 13 kuny leśnej *Martes martes* z procentem podobieństwa równym 98,08%. Stuprocentowe pokrycie zapytania oraz bardzo bliskie zeru wartości E (E value) dla wszystkich przyrównań, świadczy o istotności analizy. Wyniki sugerują, że badana sekwencja jest wysoce konserwatywna w obrębie rodziny łąsicowatych oraz specyficzna gatunkowo. Warto zwrócić uwagę, że porównywane sekwencje są jedynie przewidywaniami na podstawie bioinformatycznych algorytmów metodą Gnomon (Souvov i wsp., 2010) a nie wynikami przeprowadzonych eksperymentów, stąd konieczność ich zweryfikowania.

Job Title 0_Ex.1-7
 RID [B1H99DGR013](#) Search expires on 08-06 20:27 pm [Download All](#) ▾
 Program BLASTN [?](#) [Citation](#) ▾
 Database nt [See details](#) ▾
 Query ID lcl|Query_4387957
 Description 0_Ex.1-7
 Molecule type dna
 Query Length 3031
 Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#) [?](#)

Filter Results

Organism only top 20 will appear exclude

[+ Add organism](#)

Percent Identity to E value to Query Coverage to

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download ▾ Select columns ▾ Show [?](#)

select all 10 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

| | Description | Scientific Name | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len | Accession |
|-------------------------------------|---|-------------------------------------|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------|--------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | PREDICTED: Neovison vison SKI family transcriptional corepressor 2 (SKOR2), mRNA | Neogale vison | 5544 | 5544 | 100% | 0.0 | 99.67% | 3033 | XM_044240987.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | PREDICTED: Mustela nigripes SKI family transcriptional corepressor 2 (SKOR2), transcript variant X2, m... | Mustela nigripes | 5323 | 5323 | 100% | 0.0 | 98.35% | 3998 | XM_059409611.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | PREDICTED: Mustela nigripes SKI family transcriptional corepressor 2 (SKOR2), transcript variant X1, m... | Mustela nigripes | 5323 | 5323 | 100% | 0.0 | 98.35% | 4044 | XM_059409610.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | PREDICTED: Mustela lutreola SKI family transcriptional corepressor 2 (SKOR2), transcript variant X2, m... | Mustela lutreola | 5317 | 5317 | 100% | 0.0 | 98.32% | 3554 | XM_059139659.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | PREDICTED: Mustela lutreola SKI family transcriptional corepressor 2 (SKOR2), transcript variant X1, m... | Mustela lutreola | 5317 | 5317 | 100% | 0.0 | 98.32% | 3579 | XM_059139658.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | PREDICTED: Mustela putorius furo SKI family transcriptional corepressor 2 (SKOR2), mRNA | Mustela putoriu... | 5306 | 5306 | 100% | 0.0 | 98.25% | 3756 | XM_045065774.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | PREDICTED: Enhydra lutris kenyonii SKI family transcriptional corepressor 2 (LOC111142763), mRNA | Enhydra lutris k... | 5289 | 5289 | 100% | 0.0 | 98.15% | 3033 | XM_022496060.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | PREDICTED: Meles meles SKI family transcriptional corepressor 2 (SKOR2), mRNA | Meles meles | 5284 | 5284 | 100% | 0.0 | 98.12% | 3251 | XM_046025977.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | PREDICTED: Lutra lutra SKI family transcriptional corepressor 2 (SKOR2), mRNA | Lutra lutra | 5262 | 5262 | 100% | 0.0 | 98.02% | 3153 | XM_047698358.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Martes martes genome assembly, chromosome: 13 | Martes martes | 4521 | 5333 | 100% | 0.0 | 98.08% | 93658086 | OY734076.1 |

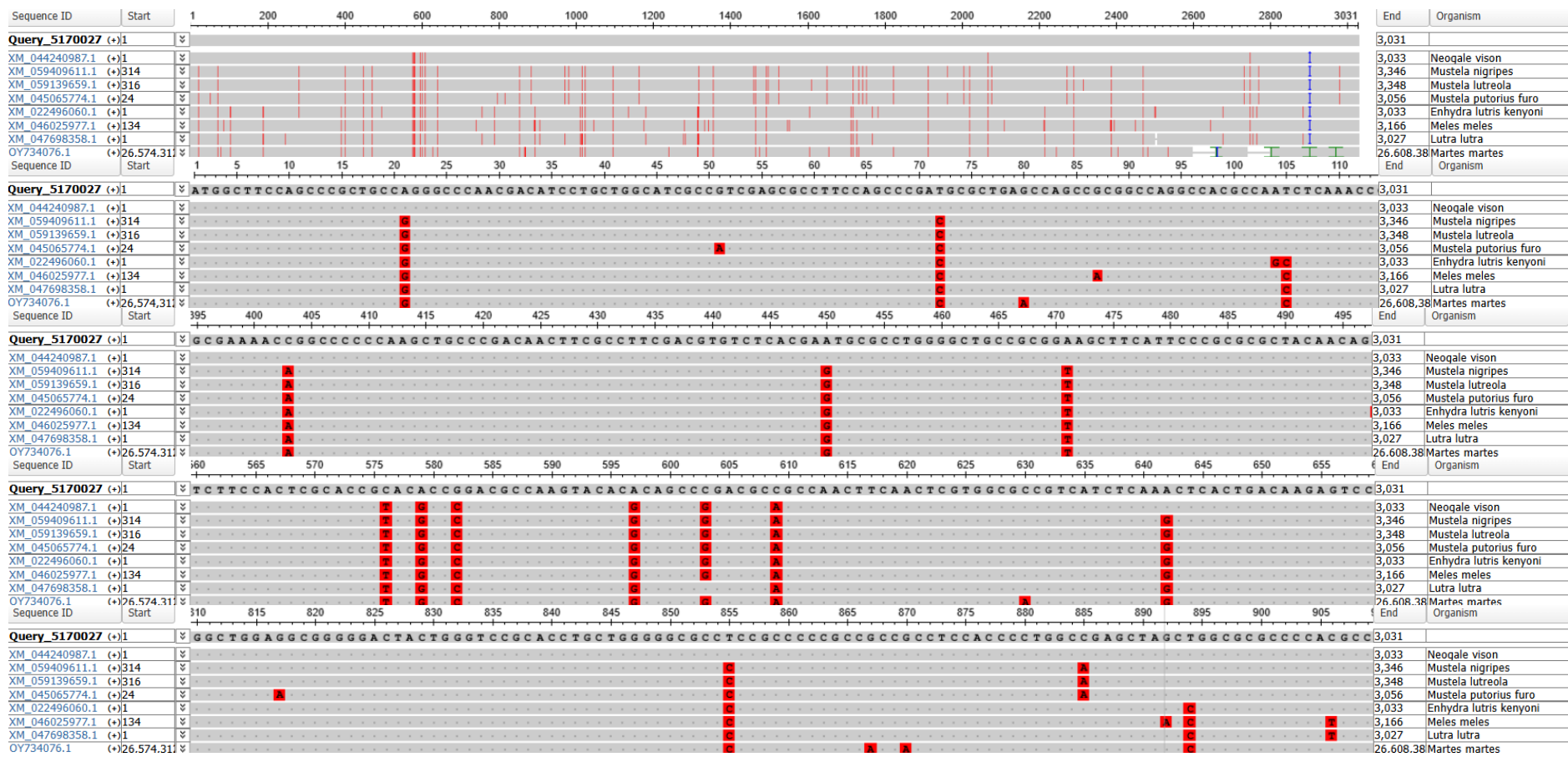
Ryc. 32. Porównanie sekwencji genu *SKOR2* pobranej z bazy Ensembl z innymi sekwencjami dostępnymi w bazie NCBI

Na podstawie analizy na platformie BLAST z wykorzystaniem narzędzia MSA Viewer oceniono polimorfizm molekularny genu *SKOR2*, porównując sekwencję pobraną z bazy Ensembl z innymi sekwencjami zdeponowanymi w bazie NCBI (rycina 33). Były to homologi genu *SKOR2* u innych gatunków z rodziny łąsicowatych (*Mustelidae*). Analiza obejmowała gatunki takie jak *Mustela nigripes*, *Mustela putorius furo*, *Mustela lutreola*, *Lutra lutra*, *Meles meles*, *Enhydra lutris kenyonii* oraz *Martes martes*. Stwierdzono obecność 27 miejsc polimorficznych, które są rozproszone wzdłuż całej długości sekwencji genu *SKOR2*: 21A>G, 72T>C, 403C>A, 450A>G, 471A>T, 576C>T, 579A>G, 582G>C, 597A>G, 603C>G, 609C>A, 642A>G, 855T>C, 1017A>G, 1023C>T, 1096A>G, 1318A>G, 1356A>G, 1467T>G, 1494T>G, 1719G>C, 1914C>A, 2022A>G, 2069A>C, 2292T>C, 2388T>C, 2472T>C, 2748T>G. Polimorfizmy te są substytucjami pojedynczych nukleotydów (SNPs). Trzy z nich (21A>G, 72T>C, 471A>T) dotyczą zmiany pierwszego nukleotydu w kodonie, co może mieć wpływ na stabilność struktury RNA oraz zmianę kodowanego aminokwasu. Siedem z nich różnicuje także sekwencję przewidywaną genu *SKOR2* dla *Neogale vison* (zdeponowaną w bazie danych NCBI pod numerem akcesyjnym XM_044240987.1) w odniesieniu do sekwencji referencyjnej genu *SKOR2* pobranej z bazy Ensembl. Są to:

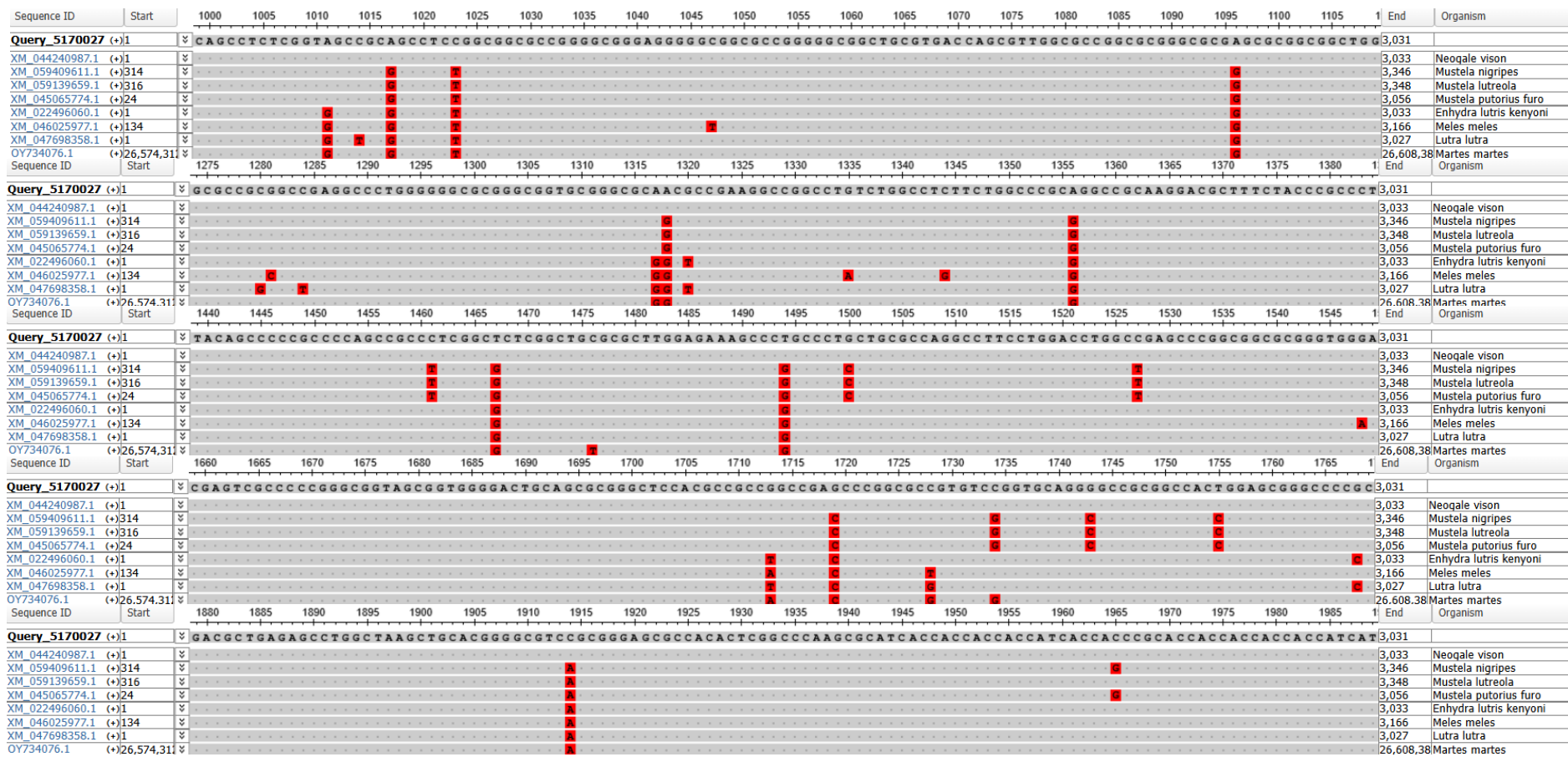
- cztery tranzycje: 576C>T, 579A>G, 597A>G, 642A>G,
- oraz trzy transwersje 582G>C, 603C>G, 609C>A.

Analiza wykazała istnienie polimorfizmu molekularnego genu *SKOR2* wśród gatunków należących do rodziny łąsicowatych. Gen *SKOR2* jest specyficzny gatunkowo.

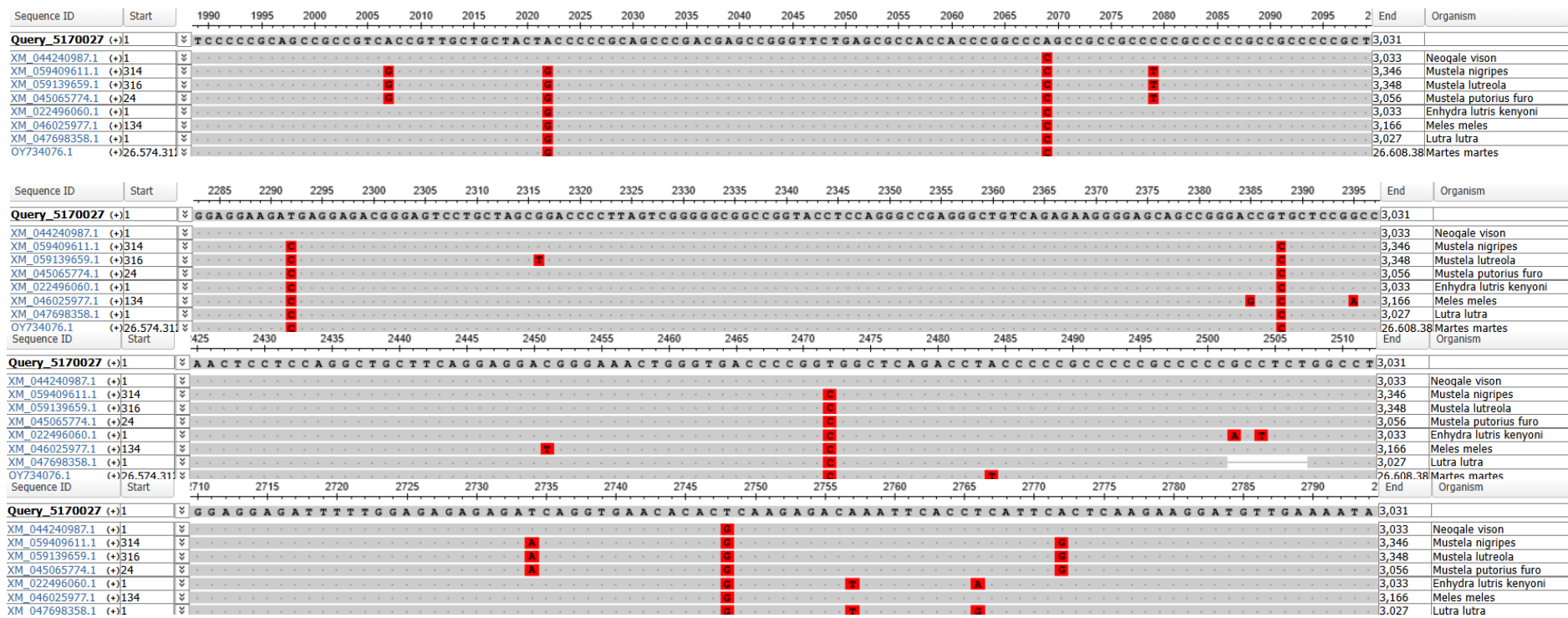
Na podstawie analizy sekwencji genu *SKOR2* przeprowadzonej przy użyciu algorytmu BLAST wygenerowano drzewo filogenetyczne (Ryc.34). Analiza dotyczyła gatunków z rodziny *Mustelidae*, gdzie porównano podobieństwo sekwencji mRNA genu *SKOR2*. Sekwencje są grupowane w trzy kłady. Oddzielny kład tworzy sekwencja referencyjna genu *SKOR2* pobrana z bazy danych Ensembl wraz z przewidywaną sekwencją *SKOR2* dla norki amerykańskiej (XM_044240987.1). Kolejny kład tworzą sekwencje przewidywane genu *SKOR2* dla *Meles meles*, *Enhydra lutris kenyonii* oraz *Lutra lutra*. Kolejny kład zawiera wyłącznie gatunki z rodzaju *Mustela*: *Mustela erminea*, *Mustela lutreola*, *Mustela putorius furo* i *Mustela nigripes*. Mają one wysoce podobne transkrypty genu *SKOR2*, co sugeruje wspólne cechy genetyczne związane z tą rodziną. Drzewo pokazuje, że pomiędzy gatunkami występują różne poziomy podobieństwa sekwencji genu *SKOR2*, co można interpretować jako odzwierciedlenie ich ewolucyjnych relacji. Gatunki z tej samej grupy są bliżej spokrewnione, a ich sekwencje genu *SKOR2* są bardziej podobne.



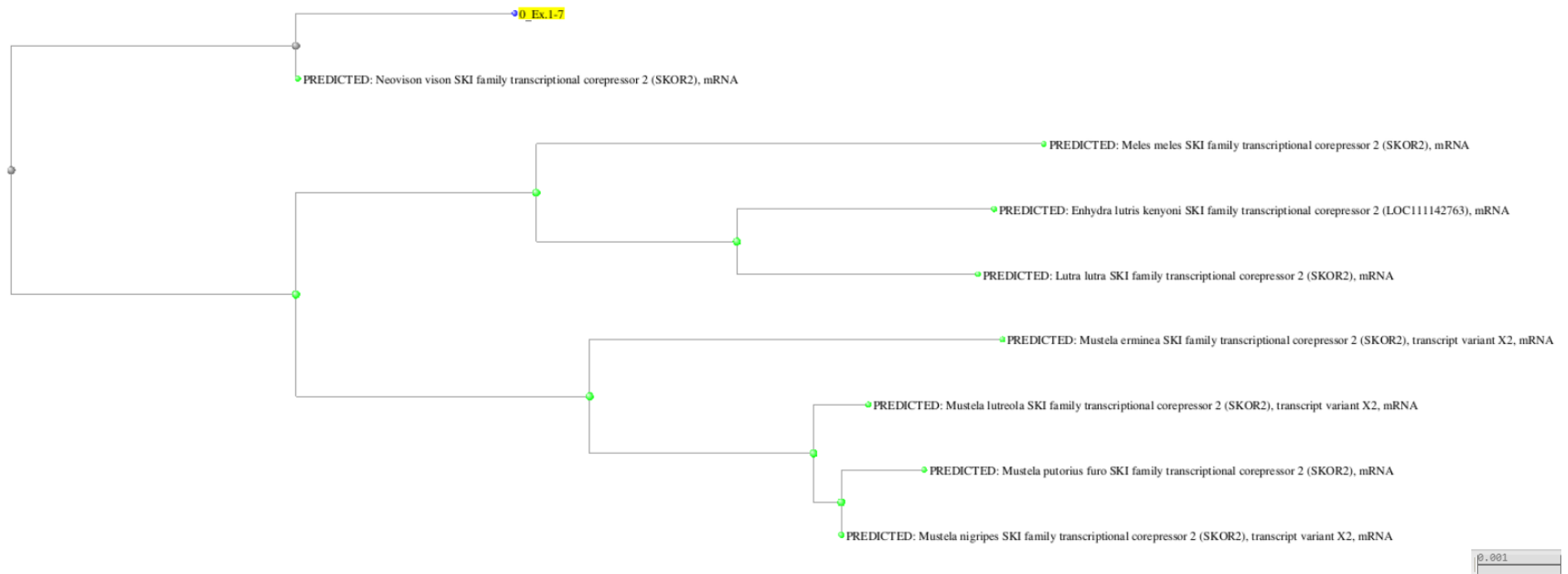
Ryc. 33. Miejsca polimorficzne genu SKOR2 u *Neogale vison* w porównaniu do innych gatunków z rodziny łasicowatych (*Mustelidae*), ocenione za pomocą narzędzia Multiple Sequence Alignment (MSA Viewer).



cd. Ryc. 33. Miejsca polimorficzne genu *SKOR2* u *Neogale vison* w porównaniu do innych gatunków z rodziny łasicowatych (*Mustelidae*), ocenione za pomocą narzędzia Multiple Sequence Alignment (MSA Viewer).



cd. Ryc. 33. Miejsca polimorficzne genu *SKOR2* u *Neogale vison* w porównaniu do innych gatunków z rodziny łasicowatych (*Mustelidae*), ocenione za pomocą narzędzia Multiple Sequence Alignment (MSA Viewer).



Ryc. 34. Drzewo filogenetyczne ilustrujące przewidywane relacje ewolucyjne pomiędzy gatunkami z rodziny *Mustelidae* na podstawie sekwencji genu *SKOR2*. Analizę wykonano metodą Neighbor-Joining (NJ) przy użyciu narzędzia BLAST. Oznaczenie O_Ex.1-8 odnosi się do referencyjnej sekwencji genu *SKOR2* dla norki amerykańskiej (*Neogale vison*), uzyskanej z bazy danych Ensembl.

Polimorfizm molekularny genu *SKOR2* u badanych osobników norki amerykańskiej (*Neogale vison*) został oceniony w odniesieniu do sekwencji referencyjnej, pobranej z bazy danych Ensembl (o identyfikatorze ENSNVIG00000001287.1). Za pomocą narzędzia BLASTN porównano sekwencje uzyskane od osobników z grupy nerek hodowlanych (oznaczonych jako 1_Ex.1-7, 2_Ex.1-7, 3_Ex.1-7) oraz dziko żyjących (4_Ex.1-7, 5_Ex.1-7, 6_Ex.1-7) do sekwencji referencyjnej oznaczonej symbolem 0_Ex.1-7. Wyniki analizy porównawczej przedstawiono na ryc 35. Zastosowano bazę zapytania 'core_nt', a długość zapytania wynosiła 3033 nukleotydy. Query Cover wynosiło 100%, co oznacza, że cała sekwencja referencyjna znalazła swoje dopasowanie w sekwencjach analizowanych osobników. Wartość maksymalnego wyniku (Max Score) dla każdej sekwencji wynosi 5596 (dla wszystkich oprócz sekwencji 5_Ex.1-7, która ma wartość 5590), co wskazuje na wysoki poziom dopasowania wszystkich sekwencji do sekwencji referencyjnej. Identyczność sekwencji względem sekwencji referencyjnej wynosi 99,97% dla wszystkich sekwencji, z wyjątkiem sekwencji 5_Ex.1-7, której podobieństwo określono na poziomie 99,93%. Wyniki te potwierdzają wysoką zgodność genetyczną między analizowanymi sekwencjami.

| | |
|----------------|---|
| Job Title | 0_Ex.1-7 |
| RID | C8ZBY6C4114 Search expires on 08-21 19:26 pm Download All ▾ |
| Program | Blast 2 sequences Citation ▾ |
| Query ID | lcl Query_7173206 (dna) |
| Query Descr | 0_Ex.1-7 |
| Query Length | 3033 |
| Subject ID | lcl Query_7173208 and 5 more subject(s) (dna) |
| Subject Descr | See details ▾ |
| Subject Length | 18198 |

Filter Results

| | | |
|--|--|--|
| Percent Identity | E value | Query Coverage |
| <input type="text"/> to <input type="text"/> | <input type="text"/> to <input type="text"/> | <input type="text"/> to <input type="text"/> |
| Filter | | Reset |

| Descriptions | | Graphic Summary | Alignments | | | | | | |
|---|--------------------------|--------------------------|---|-------------|-------------|---------|------------|----------|---------------|
| Sequences producing significant alignments | | | | | | | | | |
| | | Download ▾ | Select columns ▾ Show <input type="text" value="100"/> ? | | | | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> select all 6 sequences selected | | Graphics | Distance tree of results MSA Viewer | | | | | | |
| | Description | Scientific Name | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len | Accession |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 6_Ex.1-7 | | 5596 | 5596 | 100% | 0.0 | 99.97% | 3033 | Query_7173213 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 4_Ex.1-7 | | 5596 | 5596 | 100% | 0.0 | 99.97% | 3033 | Query_7173211 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 3_Ex.1-7 | | 5596 | 5596 | 100% | 0.0 | 99.97% | 3033 | Query_7173210 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 2_Ex.1-7 | | 5596 | 5596 | 100% | 0.0 | 99.97% | 3033 | Query_7173209 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 1_Ex.1-7 | | 5596 | 5596 | 100% | 0.0 | 99.97% | 3033 | Query_7173208 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 5_Ex.1-7 | | 5590 | 5590 | 100% | 0.0 | 99.93% | 3033 | Query_7173212 |

Ryc. 35. Porównanie (alignments) sekwencji genu *SKOR2* badanych osobników z sekwencją referencyjną pobraną z bazy Ensembl.

Na podstawie analizy z wykorzystaniem narzędzia BLAST określono miejsca polimorficzne w sekwencji genu *SKOR2* u badanych nerek (ryc. 36). Zidentyfikowano dwa SNP:

- transwersję 3000A>T – obserwowaną u wszystkich osobników, zarówno z grupy nerek hodowlanych, jak i dziko żyjących
- tranzycję 3017A>G – wykrytą wyłącznie u jednego osobnika (5_Ex.1-7), należącego do grupy nerek dzikich.

```

Query range 50: 2941 to 3000
Query      2941  CGAGAAGAAATGGTGCAACAGTTACA...T 3000
Query_7173213 2941  .....T 3000
Query_7173211 2941  .....T 3000
Query_7173210 2941  .....T 3000
Query_7173209 2941  .....T 3000
Query_7173208 2941  .....T 3000
Query_7173212 2941  .....T 3000

Query      3001  GAAAAGCTTGGTGCCCATCTCAGCAA...G 3033
Query_7173213 3001  .....G 3033
Query_7173211 3001  .....G 3033
Query_7173210 3001  .....G 3033
Query_7173209 3001  .....G 3033
Query_7173208 3001  .....G 3033
Query_7173212 3001  .....G 3033

```

Ryc. 36. Miejsca polimorficzne w obrębie genu *SKOR2* składającego się z fragmentów zsekwencjonowanych eksonów, które zostały złożone w jeden contig dla poszczególnych osobników z grupy zwierząt hodowlanych. (1_Ex 1-7 – Query_7173208, 2_Ex 1-7 – Query_7173209, 3_Ex 1-7 – Query_7173210) oraz dziko żyjących (4_Ex 1-7 – Query_7173211, 5_Ex 1-7 – Query_7173212, 6_Ex 1-7 – Query_7173213) w porównaniu do sekwencji referencyjnej pobranej z bazy Ensembl (Query-pierwsza linijka w każdym przyrównaniu).

Zebrane dane dotyczące sekwencji genu *SKOR2* zostały poddane analizie filogenetycznej, której rezultaty posłużyły do skonstruowania dendrogramu, ilustrującego relacje pokrewieństwa pomiędzy badanymi osobnikami oraz sekwencją referencyjną 0_Ex.1-7 (Ryc. 37). Sekwencje oznaczone numerami 1_Ex.1-7, 2_Ex.1-7, 3_Ex.1-7, 4_Ex.1-7, 5_Ex.1-7 oraz 6_Ex.1-7 są jednorodnie genetycznie stąd, jak widać na dendrogramie tworzą wspólny kład. Do tego kładu należy także sekwencja 0_Ex.1-7, jednak jej oddalenie od pozostałych, wskazuje na pewne różnice genetyczne. Z kolei sekwencja oznaczona numerem 5_Ex.1-7, należąca do norki pochodzącej z grupy dzikich, wykazała najniższy stopień pokrewieństwa zarówno z sekwencją referencyjną, jak i z innymi analizowanymi sekwencjami, co zostało zilustrowane na drzewie filogenetycznym jako oddzielny kład. Podsumowując, wyniki analizy filogenetycznej wskazują na znaczną jednorodność genetyczną między osobnikami hodowlanymi oraz dwoma dziko żyjącymi (4_Ex.1-7 oraz 6_Ex.1-7), co potwierdza ich bliskie pokrewieństwo. Jednocześnie, zróżnicowanie osobnika 5_Ex.1-7 względem pozostałych sekwencji sugeruje występowanie istotnych różnic genetycznych.



Ryc. 37. Drzewo filogenetyczne wygenerowane metodą Neighbor-Joining (NJ) przy użyciu narzędzia BLAST, z maksymalną dopuszczalną różnicą sekwencyjną wynoszącą 0.75 (Max Seq Difference) dla genu *SKOR2*. Sekwencję referencyjną oznaczono jako 0_Ex.1-7. Sekwencje genu *SKOR2* należące do nerek z grupy hodowlanej oznaczono numerami 1_Ex.1-7 do 3_Ex.1-7, natomiast sekwencje nerek dziko żyjących oznaczono numerami od 4_Ex.1-7 do 6_Ex.1-7.

4.7.1. Analiza podobieństwa sekwencji nukleotydowej genu *SKOR2*

W tabeli 19. zamieszczono procentowe podobieństwo sekwencji nukleotydowych genu *SKOR2*. Każda z analizowanych sekwencji (oznaczona jako 0_Ex.1-7, 1_Ex.1-7, itd.) została porównana z pozostałymi, a uzyskane wartości procentowe odzwierciedlają stopień identyczności nukleotydowej pomiędzy nimi. Zaobserwowano wysoką homologię sekwencji nukleotydowych, z większością porównań wykazujących identyczność na poziomie 100%. Sekwencja referencyjna (0_Ex.1-7) wykazuje 99,9% podobieństwa do wszystkich pozostałych sekwencji (1_Ex.1-7 do 6_Ex.1-7). Jest to wysoki stopień zbieżności, wskazujący na bliskie pokrewieństwo genetyczne pomiędzy badanymi osobnikami a sekwencją referencyjną. Sekwencje 1_Ex.1-7, 2_Ex.1-7, 3_Ex.1-7, 4_Ex.1-7 oraz 6_Ex.1-7 są jednorodne genetycznie. Sekwencja 5_Ex.1-7 wykazuje nieco niższy stopień podobieństwa (99,9%) w porównaniu do pozostałych sekwencji. Różnica ta, choć niewielka, sugeruje istnienie pojedynczych zmian nukleotydowych (np. SNP) w tej sekwencji. Jest to zgodne z wcześniejszymi analizami, które wskazywały na obecność unikalnego polimorfizmu w tej sekwencji - tranzycji 3017A>G.

Tabela 19. Ocena podobieństwa nukleotydowego [%] genu *SKOR2*, pomiędzy referencją (0_Ex.1-8), osobnikami z grupy nerek fermowych (1_Ex.1-7 – 3_Ex.1-7) i wolno żyjących (4_Ex.1-7 – 6_Ex.1-7).

| Seq-> | 1_Ex.1-7 | 2_Ex.1-7 | 3_Ex.1-7 | 4_Ex.1-7 | 5_Ex.1-7 | 6_Ex.1-6 |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 0_Ex.1-7 | 99,9 | 99,9 | 99,9 | 99,9 | 99,9 | 99,9 |
| 1_Ex.1-7 | | 100 | 100 | 100 | 99,9 | 100 |
| 2_Ex.1-7 | | | 100 | 100 | 99,9 | 100 |
| 3_Ex.1-7 | | | | 100 | 99,9 | 100 |
| 4_Ex.1-7 | | | | | 99,9 | 100 |
| 5_Ex.1-7 | | | | | | 99,9 |

Kolor czerwony – podobieństwo z sekwencją referencyjną.

Kolor zielony – podobieństwo w obrębie badanych grup - hodowlanych i dziko żyjących.

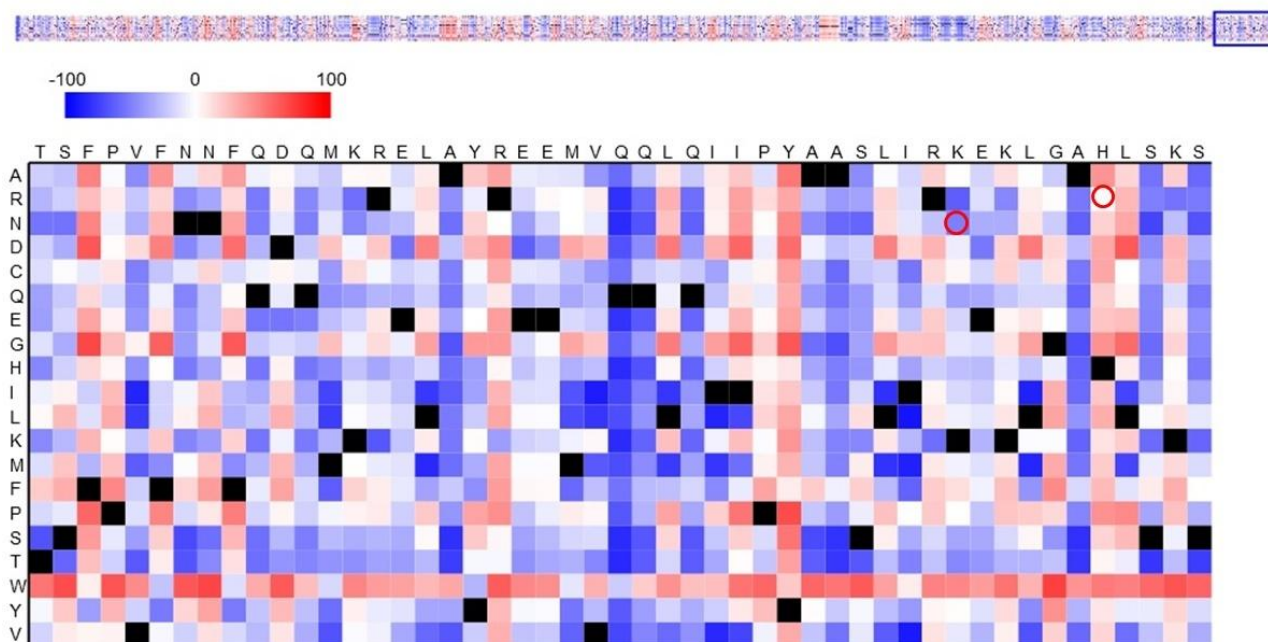
Kolor niebieski - podobieństwo pomiędzy grupą fermową i wolno żyjącą.

4.7.2. Analiza podobieństwa sekwencji aminokwasowej białka *SKOR2*

W tabeli 20. zamieszczono dane dotyczące zgodności sekwencji aminokwasowych białka *SKOR2*. Uzyskane wyniki wskazują na bardzo wysoki stopień podobieństwa aminokwasowego białka zarówno pomiędzy sekwencją referencyjną a badanymi osobnikami, jak i pomiędzy samymi badanymi osobnikami. Najbardziej zróżnicowaną sekwencję aminokwasową posiada osobnik z grupy nerek dzikich oznaczony 5_Ex.1-7, którego białko różni się w 0,2% od referencyjnego oraz o 0,1% od białka pozostałych osobników.

4.7.4. Analiza *in silico* wpływu polimorfizmów p. K1000N oraz p. H1006R na funkcjonalność białka SKOR2 z wykorzystaniem macierzy heatmap

Do oceny przewidywanych efektów funkcjonalnych wynikających z substytucji SKOR2 p.K1000N oraz p.H1006R wykorzystano macierz ciepłą (rycina 39) wygenerowaną za pomocą narzędzia bioinformatycznego SNAP2.



Ryc. 39. Przewidywanie efektów funkcjonalnych polimorfizmu SKOR2 p. K1000N oraz p. H1006R. Heatmapa substytucji aminokwasów w białku SKOR2 przygotowana w aplikacji SNAP2, przedstawia polimorficzne aminokwasy w stosunku do białka referencyjnego.

Mapa ciepła przedstawia profil wpływu różnych mutacji na poziomie aminokwasowym, gdzie każda pozycja w białku SKOR2 jest analizowana pod kątem potencjalnych efektów substytucji na funkcję białka. Taka analiza pozwala na lepsze zrozumienie molekularnych podstaw zmian w białku SKOR2 u nerek amerykańskich i ich potencjalnego wpływu na reakcje obronne oraz adaptacje tych zwierząt. Na mapie cieplnej zaznaczono (czerwoną pętlą) dwa punkty, które wskazują pozycje, w których wykryto substytucje aminokwasowe: p. K1000N (score: -55) oraz p. H1006R (score: 2). Obydwie substytucje zlokalizowane są w regionie C-końcowym białka SKOR2. Analiza *in silico* sugeruje, że polimorfizm p.K1000N może wykazywać pewien poziom negatywnego wpływu na funkcjonalność białka, podczas gdy zmiana p. H1006R wykryta wyłącznie u jednego osobnika z grupy dziko żyjących (5 Ex.1-7) ma raczej neutralny wpływ na białko SKOR2. Polimorfizm ten prawdopodobnie nie wywołuje znaczącego efektu strukturalnego ani funkcjonalnego w porównaniu do białka referencyjnego.

5. Dyskusja

Badania polimorfizmów sekwencji DNA u nerek hodowlanych oraz dziko żyjących dostarczają cennych informacji na temat różnorodności genetycznej tych grup, a także pozwalają na zrozumienie wpływu zmienności genetycznej na funkcjonalność białek, takich jak *SRSF5*, *RNF165* oraz *SKOR2*. Zidentyfikowane polimorfizmy w sekwencjach badanych genów (*SRSF5*, *RNF165* oraz *SKOR2*) wskazują na obecność zmienności genetycznej w obu grupach nerek.

Wyniki badań własnych wykazały, że polimorfizmy w genie *SRSF5* występują wyłącznie u nerek hodowlanych, a ich brak u dziko żyjących osobników może sugerować różnice w presji selekcyjnej pomiędzy tymi grupami. Zidentyfikowano trzy zmiany nukleotydowe w sekwencji genu *SRSF5*, które różnicują badane grupy. Pierwszą z nich była transwersja 173A>C wykryta jedynie u osobników z grupy hodowlanej (1_Ex.1-8, 2_Ex.1-8, 3_Ex.1-8). Fakt, że mutacja ta występuje tylko w populacji hodowlanej, może sugerować wpływ selekcji hodowlanej, gdzie sztuczne doборы mogły sprzyjać powstaniu i utrzymaniu tej mutacji. Z kolei brak tej zmiany u osobników dziko żyjących może wskazywać na odmienne strategie adaptacyjne w naturalnym środowisku, w którym mutacje wpływające na kluczowe procesy, takie jak splicing, mogłyby być eliminowane w wyniku doboru naturalnego. Kolejnym polimorfizmem była insercja 758ins.T – wykryta wyłącznie u jednego osobnika hodowlanego (3_Ex.1-8). Tego typu zmiana może w istotny sposób wpływać na funkcję białka, prowadząc do zmiany ramki odczytu lub przerwania syntezy białka. Z uwagi na to, że mutacja ta występuje jedynie u jednego osobnika z grupy hodowlanej, sugeruje to, że może być wynikiem pracy hodowlanej. Trzecim polimorfizmem w obrębie genu *SRSF5* była transwersja 916G>T – wykryta u tego samego osobnika (3_Ex.1-8) z grupy hodowlanej, co podkreśla wewnątrzgrupową zmienność genetyczną wśród nerek hodowlanych. Obecność kilku polimorfizmów u jednego osobnika może świadczyć o unikalnych wariantach genetycznych, które mogą stanowić przyczynę do prowadzenia selekcji w kierunku zmian w fenotypie, za które odpowiada gen *SRSF5*.

Fakt, że wszystkie zidentyfikowane polimorfizmy genu *SRSF5* dotyczą wyłącznie nerek hodowlanych sugeruje, że zwierzęta te charakteryzują się pewnymi unikalnymi mutacjami, które mogą wpływać poprzez selekcję na kształtowanie się ich fenotypu. Z drugiej strony, brak takich specyficznych polimorfizmów u nerek dziko żyjących może wynikać z różnych warunków środowiskowych, które promują odmienny zestaw wariantów genetycznych, bardziej przystosowanych do przetrwania w naturalnym środowisku. Brak

zmienności w przypadku zwierząt dzikich może wynikać z procesów adaptacyjnych do otaczającego środowiska, w których na drodze naturalnej selekcji uzyskano norki najlepiej odnajdujące się w niekorzystnych warunkach środowiskowych (ograniczony okresowo dostęp do pożywienia, brak suplementacji witamin, mikro- i makroelementów itp.), co może powodować osłabienie układu odpornościowego.

Badania własne wykazały istnienie dwóch polimorfizmów w sekwencji genu *RNF165* u badanych osobników: tranzykcji 141A>G oraz 596A>G. Zmiana 141A>G mimo, iż występowała zarówno u osobników z grupy hodowlanej (1_Ex.1-8 oraz 2_Ex.1-8), jak i dzikiej (4_Ex.1-8), nie skutkowała zmianą aminokwasu, a tym samym zmianą struktury i funkcji białka RNF165. Drugi zidentyfikowany polimorfizm jest szczególnie interesujący ze względu na jego obecność u wszystkich analizowanych osobników, zarówno hodowlanych, jak i dziko żyjących. Tranzykcja 596A>G, która odpowiada zmianie w sekwencji białka p.R199K, wpływa na jego funkcjonalność ocenioną przez program SNAP2 na poziomie 33, co oznacza, że wywiera umiarkowany wpływ na fenotyp. Obecność wspólnych polimorfizmów zarówno w populacjach hodowlanych, jak i dziko żyjących, takich jak 141A>G i 596A>G, może świadczyć o wspólnym pochodzeniu. Podsumowując, wyniki te wskazują na istnienie polimorfizmów nukleotydowych w genie *RNF165* zarówno u nerek hodowlanych, jak i dziko żyjących. Wspólne mutacje mogą odzwierciedlać ewolucyjną historię tych populacji, a ich analiza może dostarczyć cennych informacji na temat procesów adaptacyjnych i genetycznych zachodzących w populacjach nerek. Dalsze badania, w tym analiza funkcjonalna tych polimorfizmów, są konieczne, aby w pełni zrozumieć ich wpływ na ekspresję genu oraz związane z nim mechanizmy molekularne.

Na szczególne podkreślenie zasługuje gen *SKOR2*, gdyż mimo niewielkiej liczby miejsc polimorficznych, wykryto dwie zmiany niesynonimiczne. W przeprowadzonych analizach zidentyfikowano: transwersję 3000A>T, występującą zarówno u wszystkich nerek hodowlanych, jak i dziko żyjących, oraz tranzykcję 3017A>G, obserwowaną wyłącznie u jednego osobnika z grupy nerek dzikich (5_Ex.1-7). Obecność polimorfizmów w obu grupach sugeruje, że mimo izolacji hodowlanej, pewne polimorfizmy są wspólne dla obu grup, co może wynikać z bliskiego pokrewieństwa genetycznego. Pomimo występowania polimorfizmu 3000A>T u wszystkich badanych osobników, jego efekt funkcjonalny na białko ma charakter neutralny. Mutacja jest powszechna w grupie nerek, ale nie wpływa na funkcję białka. Z kolei tranzykcja 3017A>G, zidentyfikowana u osobnika 5_Ex.1-7, powoduje zmianę aminokwasu w białku SKOR2 p.H1006R.

Problemem różnicowania nerek hodowlanych i dziko żyjących bazując na

informacjach markerów molekularnych zajmowała się Michalska-Parda i wsp. (2009) oraz Horecka (2015, 2019). Na podstawie analizy 11 *loci* mikrosatelitarnych Michalska-Parda i wsp. (2009) wykazali, że norki hodowlane i wolno żyjące na terenie Polski stanowią dwie genetycznie blisko spokrewnione, ale odrębne grupy.

Zupełnie odmienne rezultaty wskazujące na odrębność między populacjami zwierząt dziko żyjących a hodowlanych, oparte na analizie polimorfizmu mikrosatelitarnego, różnic mtDNA i wybranych sekwencji genów jądrowych przedstawiła w swojej dysertacji doktorskiej Horecka (2015). W swoich badaniach na podstawie 23 sekwencji mikrosatelitarnych stwierdziła różnice w liczbie i rodzaju alleli zidentyfikowanych w populacjach norki amerykańskiej hodowlanej, dziko żyjącej i zdziczałej, w tym występowanie alleli prywatnych. Wykazała podział polskiej populacji wolno żyjącej na dwie odrębne genetycznie subpopulacje: północno-wschodnią charakteryzującą się znacznym podobieństwem genetycznym do rodzimej populacji norek z Ameryki Północnej i północno-zachodnią o większym podobieństwie genetycznym do norek fermowych (Horecka, 2015). Na podstawie analizy DNA mitochondrialnego 5 genów *CYTB*, *COI*, *COII*, *ND4*, *ATP6* stwierdziła obecność „haplotypów podstawowych”, gdzie najwyższym zróżnicowaniem genetycznym charakteryzowała się populacja norki dzikiej północnoamerykańskiej, natomiast najniższym – polska populacja norki zdziczałej (Horecka, 2019). Wykazała wysoki konserwatyzm w obrębie badanych fragmentów genów jądrowych *TYR* i *LYST*, wskazując na ograniczone ich wykorzystanie w badaniach różnicowania genetycznego populacji norki amerykańskiej (Horecka, 2015).

Pomimo sugestii, że geny jądrowe wykazują konserwatyzm, w badaniach własnych wykazano istnienie wielu polimorfizmów zarówno w populacji norek dziko żyjących, jak i hodowlanych w obrębie genów *SRSF5*, *RNF165* i *SKOR2*. Prowadzenie dalszych badań, obejmujących większą liczbę osobników oraz *loci* genowych, może dostarczyć bardziej szczegółowych informacji na temat zmienności genetycznej i jej wpływu na fenotypy norek hodowlanych i dziko żyjących.

Na podstawie przeprowadzonych analiz można stwierdzić, że populacje norek hodowlanych i dziko żyjących różnią się pod względem stopnia polimorfizmu genetycznego w genach *SRSF5*, *RNF165* oraz *SKOR2*. Osobniki hodowlane wykazują wyższy poziom polimorfizmu w genie *SRSF5*, co może być wynikiem intensywnej selekcji cech użytkowych w procesie hodowli. W przeciwieństwie do tego, populacje dziko żyjące charakteryzują się brakiem polimorfizmów w tym genie. W przypadku genu *RNF165* różnice między populacjami są mniej wyraźne. Jednakże obecność wspólnych mutacji w obu grupach zwierząt wskazuje na istnienie wspólnego przodka, od którego pochodzi zarówno populacja hodowlana, jak i dziko

żyjąca. W odniesieniu do genu *SKOR2*, polimorfizm 3017A>G wykryty wyłącznie u norki dzikiej (5_Ex.1-7) może wskazywać na wyższą różnorodność genetyczną w tej grupie. Polimorfizmy występujące w grupie nerek hodowlanych to: *SRSF5*: 173A>C, 758ins.T, 916G>T; *RNF165* 141A>G, 596A>G oraz *SKOR2* 3000A>T. Natomiast w grupie nerek dzikich zaobserwowano: *RNF165* 141A>G, 596A>G oraz *SKOR2* 3000A>T, 3017A>G. Podsumowując, różnice w zakresie polimorfizmu genetycznego między norkami hodowlanymi a dziko żyjącymi wskazują na istotną rolę selekcji w procesach hodowlanych, które mogą prowadzić do zwiększenia różnorodności genetycznej w obrębie pewnych genów, takich jak *SRSF5*.

W podjętych badaniach stwierdzono zróżnicowanie nukleotydowe w obrębie wybranych eksonów trzech genów (*SRSF5*, *RNF165*, *SKOR2*) pomiędzy poszczególnymi osobnikami. Gen *SRSF5* składał się z ośmiu eksonów. Miejsca polimorficzne genu *SRSF5* zidentyfikowane w niniejszych badaniach to: 173A>C, insercja 758ins.T oraz transwersja 916G>T. Polimorfizm 173A>C, zlokalizowany w pierwszym eksonie, a dokładnie w jego obszarze 5'UTR, nie wpływa bezpośrednio na sekwencję kodującą białko, lecz może wpływać na regulację transkrypcji lub stabilność mRNA. Zgodnie z doniesieniami Master i Nauman (2014), obszary 5'UTR odgrywają kluczową rolę w regulacji inicjacji translacji, co wskazuje, że mutacja zlokalizowana w tym regionie może wpływać na poziom ekspresji genu bez bezpośredniego oddziaływania na sekwencję kodującą białko. Takie zmiany mogą modyfikować stabilność mRNA, efektywność translacji lub sposób wiązania się z białkami regulatorowymi, a tym samym wpływać na procesy posttranskrypcyjne. Jak wskazuje Kwinta (2008) specyficzne sekwencje mRNA umiejscowione w 5'UTR mogą w dużej mierze kontrolować potranskrypcyjną regulację ekspresji genów. Podkreśla on również, że inicjacja translacji jest kluczowym etapem regulacyjnym, w którym struktura 5'UTR odgrywa fundamentalną rolę, wpływając na zdolność wiązania czynników białkowych inicjujących translację. Zmienność sekwencji w obrębie regionu 5'UTR genu może także mieć znaczenie w patogenezie wybranych nowotworów (Kwinta, 2008). Przykładem jest mutacja typu transwersji G-34T, zlokalizowana 34 pary zasad przed trójką startową w obszarze 5'UTR genu *CDKN2A*, która, jak podaje Liu i wsp. (1999), predysponuje do rozwoju czerniaka.

Z kolei insercja 758ins.T, zlokalizowana w obrębie siódmego eksonu genu *SRSF5*, wpływa na sekwencję kodującą, co może prowadzić do zmiany ramki odczytu. Tego typu mutacja może skutkować produkcją niefunkcjonalnego białka, potencjalnie zmieniając jego strukturę i funkcję, a nawet prowadzić do przedwczesnego zakończenia translacji. Zmiana ta może mieć istotny wpływ na właściwości białka *SRSF5*, które pełni rolę w regulacji splicingu.

Polimorfizm 916G>T dotyczy części kodującej genu *SRSF5*, a dokładnie jego ostatniego, a więc ósmego eksonu. Skutkuje on zmianą pojedynczego aminokwasu p.S229I. Tego typu mutacje, które występują w końcowych eksonach, mogą mieć znaczący wpływ na terminacyjny etap biosyntezy białka, co może mieć implikacje dla jego stabilności oraz interakcji z innymi białkami. Holbrook i wsp. (2004) oraz Khajavi i wsp. (2006) stwierdzili w swoich badaniach, że mutacje typu SNP missensownego, zlokalizowane w ostatnich eksonach, mogą znacząco wpływać na strukturalne i funkcjonalne właściwości kodowanego białka, a także na przebieg translacji. W odróżnieniu od mutacji nonsensownych, które często prowadzą do degradacji mRNA przez mechanizm NMD (*nonsense-mediated mRNA decay*), mutacje missensowne w końcowym eksonie omijają ten proces, co pozwala na powstanie pełnej, choć zmienionej wersji białka. Skutki takiej mutacji zależą od lokalizacji zmiany nukleotydu, a co za tym idzie aminokwasu oraz jego wpływu na konformację, stabilność oraz funkcje białka (Holbrook i wsp., 2004; Khajavi i wsp., 2006). Teraoka i wsp. (1999) w badaniach stwierdzili, że mutacje w ludzkim genie *ATM*, zlokalizowane w ostatnim eksonie powodują zaburzenie splicingu, co skutkuje skróceniem białka o kluczowe dla jego funkcji domeny.

Brak zróżnicowania nukleotydowego w eksonach 2., 3., 4., 5. i 6. genu *SRSF5* wskazuje na wysoki stopień konserwatywności tych fragmentów. Sekwencje eksonów od 2 do 6 zachowały pełną zgodność między badanymi osobnikami, co sugeruje, że te regiony mogą być mniej podatne na mutacje i mogą pełnić kluczowe funkcje w zachowaniu integralności strukturalnej i funkcjonalnej białka *SRSF5*.

Gen *RNF165* zbudowany jest z ośmiu eksonów. W obrębie sekwencji tego genu zidentyfikowano polimorfizmy nukleotydowe - dwie tranzycje: 141A>G oraz 596A>G. Zmiana 141A>G zlokalizowana w drugim eksonie nie wywiera wpływu na zmianę aminokwasu, ponieważ jest mutacją synonimiczną. Kolejna tranzycja 596A>G zlokalizowana jest w eksonie 5 genu *RNF165* i ma swoje konsekwencje w postaci zmiany argininy na lizynę w pozycji 199 - p.R199K. Eksony 1., od 3. do 4. oraz od 6 do 8. genu *RNF165* w niniejszych badaniach zostały ocenione jako konserwatywne. Uzyskane sekwencje dla wszystkich badanych osobników wykazały 100% podobieństwo nukleotydowe. Brak zróżnicowania nukleotydowego sugeruje, że te regiony są mniej podatne na mutacje i mogą pełnić kluczowe funkcje w zachowaniu integralności strukturalnej i funkcjonalnej białka *RNF165*.

Gen *SKOR2* zbudowany jest z siedmiu eksonów. W ramach badań nad zmiennością tego genu zidentyfikowano dwa miejsca polimorficzne: transwersję 3000A>T oraz tranzycję 3017A>G. Zlokalizowane są one w siódmym eksonie, co oznacza, iż ekson ten wyróżnia się na

tle pozostałych sześciu wyższym zróżnicowaniem nukleotydowym. Stwierdzony brak zmienności genetycznej w eksonach od 1. do 6. genu *SKOR2* u wszystkich badanych osobników wskazuje na wysoki stopień konserwatywności sekwencji w tych regionach. Taki konserwatywność może wskazywać na kluczowe funkcje tych eksonów w utrzymaniu integralności strukturalnej oraz prawidłowym funkcjonowaniu białka *SKOR2*.

Jak podają Teraoka i wsp. (1999) konserwatywne eksony często pełnią fundamentalne role w strukturze i funkcji białek, a ich zmiany mogą prowadzić do poważnych zaburzeń biologicznych. W ich badaniach nad genem *ATM* jeden pacjent (AT138LA) miał tylko transkrypty *ATM* z usuniętym eksonem 44. Badanie sekwencji genomowej w eksonie 44 i wokół niego ujawniło tylko jedną homozygotyczną zmianę, substytucję G→A w pozycji 6154, która jest konserwatywna w mysiej sekwencji *ATM*. Wynikająca z tego niekonserwatywna substytucja aminokwasowa, E→K, może zmienić strukturę lub funkcję białka, ale niekoniecznie musi zakończyć jego translację (Teraoka i wsp., 1999).

Zidentyfikowane różnice w zakresie polimorfizmów nukleotydowych w eksonach genów *SRSF5*, *RNF165* oraz *SKOR2* wskazują na wyraźne zróżnicowanie genetyczne pomiędzy poszczególnymi osobnikami, zarówno w grupie nerek hodowlanych, jak i dziko żyjących. Polimorfizmy wykryte wyłącznie u osobników hodowlanych, takie jak te w genie *SRSF5*, sugerują, że selekcja hodowlana może wpływać na zmienność genetyczną, prowadząc do powstawania specyficznych mutacji. Z kolei polimorfizmy wspólne dla obu grup, jak tranzycja 596A>G w genie *RNF165*, może być rezultatem konserwatywnych mechanizmów genetycznych, które zostały utrzymane w obu populacjach.

Obecność unikalnych polimorfizmów w populacji dziko żyjącej, takich jak tranzycja 3017A>G w genie *SKOR2*, może świadczyć o większej różnorodności genetycznej tej grupy, co może być efektem adaptacji do zmieniających się warunków środowiskowych. Analiza ta podkreśla znaczenie badań nad polimorfizmem genetycznym w kontekście oceny różnorodności genetycznej oraz zrozumienia procesów adaptacyjnych i ewolucyjnych w obrębie populacji nerek.

Kolejnym założeniem była próba odpowiedzi na pytanie, czy istnieje zróżnicowanie wyników pomiędzy sekwencjonowaniem wysokoprzepustowym (*Next-Generation Sequencing*, NGS) a wykonanym metodą Sangera w zakresie analizowanych genów. Sekwencjonowanie genów stało się kluczowym narzędziem w badaniach biologii molekularnej, jednak różnice pomiędzy technologiami, takimi jak sekwencjonowanie wysokoprzepustowe (NGS) oraz klasyczna metoda Sangera, budzą zainteresowanie badaczy i są przedmiotem licznych analiz.

Zasadnicza różnica pomiędzy tymi metodami polega na ich zdolności do równoczesnej analizy różnych fragmentów genomu, co może prowadzić do zróżnicowanych wyników w badaniach dotyczących tych samych genów. Główną innowacją, jaką wnoszą technologie sekwencjonowania nowej generacji (NGS) jest możliwość uzyskania, w jednym cyklu pracy urządzenia, ponad miliarda krótkich odczytów (Metzer, 2010).

Na podstawie wyników własnych wykryto różnice w sekwencji genu *SRSF5* uzyskanej metodą sekwencjonowania Sangera, techniką NGS a predykcją za pomocą algorytmów bioinformatycznych Gnomon. W odróżnieniu od pozyskiwania danych drogą sekwencjonowania Sangera czy NGS, metoda Gnomon polega na wnioskowaniu o strukturze genu lub transkryptu na podstawie podobieństwa do innych znanych sekwencji a nie bezpośrednim potwierdzeniu eksperymentalnym w laboratorium (Souvorov i wsp., 2010).

Proces przewidywania genów w NCBI opiera się na połączeniu dwóch głównych podejść: wyszukiwania homologii oraz modelowania *ab initio*. W kontekście modelowania *ab initio* jest ono wykorzystywane na trzy sposoby: po pierwsze, do oceny dopasowań i lokalizowania optymalnych regionów kodujących (CDS), po drugie, do rozszerzania częściowych dopasowań, i po trzecie, do tworzenia nowych modeli genów w przypadku braku informacji eksperymentalnych. Dzięki temu procesowi modele genów mogą być klasyfikowane jako całkowicie wspierane, częściowo wspierane lub niewspierane, w zależności od dostępnych danych eksperymentalnych. Przed rozpoczęciem adnotacji genomu gromadzi się dostępne dane, takie jak cDNA dla badanego organizmu oraz blisko spokrewnionych gatunków. Generowane są także dwa zestawy białek: białka docelowe, które obejmują białka znane dla badanego organizmu, oraz białka z poszukiwań, będące szerszym zestawem eukariotycznych białek. Dopasowania białek z zestawu docelowego do genomu służą wsparciu przewidywań w pierwszej rundzie, natomiast białka z zestawu poszukiwanych są używane do udoskonalania modeli genów tylko wtedy, gdy są wystarczająco podobne do przewidywanych modeli (Souvorov i wsp., 2010).

W adnotacji NCBI, algorytm Gnomon porównuje sekwencje cDNA i białek docelowych z przewidywaniami modelu oraz integruje wyniki z szerszym zestawem białek, aby zoptymalizować wyniki. Następnie tworzy się dopasowania intron-ekson, łączy się częściowe dopasowania w dłuższe modele. Dla każdego genomu NCBI przeprowadza procedurę Gnomon, której wyniki są przedstawiane na mapie modeli *ab initio* w przeglądarce NCBI. Ostateczne wyrównania sekwencji referencyjnych (RefSeq) zastępują modele Gnomon tam, gdzie jest to możliwe, a modele z błędami, takie jak przesunięcia ramki odczytu lub przedwczesne zatrzymania, są klasyfikowane jako pseudogeny. Ten proces jest szczególnie

istotny w badaniach genomowych, ponieważ umożliwia wykorzystanie zarówno danych eksperymentalnych, jak i metod predykcyjnych, zwłaszcza w sytuacjach, gdy dane eksperymentalne są ograniczone. Dzięki wysokiej precyzji algorytmu Gnomon oraz integracji danych eksperymentalnych, wyniki stają się bardziej wiarygodne i mogą stanowić podstawę do dalszych badań genomowych (Souvorov i wsp., 2010).

W sekwencji referencyjnej pobranej z bazy Ensembl genu *SRSF5* w pozycji 173 występuje adenina. Natomiast w przewidywanych metodą Gnomon i zdeponowanych w NCBI sekwencjach przedstawicieli z rodziny łasicowatych oraz dwóch przewidywanych sekwencji transkryptów genu *SRSF5* o numerach XM_044232293.1 oraz XM_044232294.1 zdeponowanych w bazie NCBI występuje zmiana adeniny na cytozynę w pozycji 173A>C.

Kolejną wykrytą różnicą pomiędzy wynikami uzyskanymi metodą NGS a przewidywaniem metodą Gnomon były polimorfizmy względem sekwencji referencyjnej genu *RNF165* (ENSNVIG00000000779) a sekwencjami przewidywanymi dla innych gatunków z rodziny *Mustelidae*. Stwierdzono trzy mutacje typu tranzycja: 486T>C, 654A>G, 687T>C, a także transwersję 771A>T/C. W sekwencji referencyjnej genu *RNF165*, powstałej przez złożenie scaffoldów metodą NGS w pozycji 141 występuje adenina, natomiast w przeprowadzonych analizach własnych metodą Sangera wykryto guaninę w tej pozycji (*RNF165* 141A>G), co świadczy o różnicy między danymi otrzymanymi tymi dwoma metodami. Innym polimorfizmem potwierdzającym istnienie różnic między wynikami sekwencjonowania metodą NGS a Sangera jest występowanie adeniny w pozycji 596 w sekwencji referencyjnej, zaś guaniny (596A>G) w sekwencji uzyskanej w badaniach własnych metodą Sangera.

Stwierdzono różnice między wynikami uzyskanymi metodą NGS a przewidywaniem metodą Gnomon względem sekwencji referencyjnej genu *SKOR2* (ENSNVIG00000001287.1) a sekwencjami przewidywanymi dla innych gatunków z rodziny *Mustelidae*. Stwierdzono obecność 27 miejsc polimorficznych, które są rozproszone wzdłuż całej długości sekwencji genu *SKOR2*: 21A>G, 72T>C, 403C>A, 450A>G, 471A>T, 576C>T, 579A>G, 582G>C, 597A>G, 603C>G, 609C>A, 642A>G, 855T>C, 1017A>G, 1023C>T, 1096A>G, 1318A>G, 1356A>G, 1467T>G, 1494T>G, 1719G>C, 1914C>A, 2022A>G, 2069A>C, 2292T>C, 2388T>C, 2472T>C, 2748T>G.

W sekwencji referencyjnej genu *SKOR2*, powstałej przez złożenie scaffoldów metodą NGS w pozycji 3000 występuje adenina, natomiast w przeprowadzonych analizach własnych metodą Sangera wykryto tyminę w tej pozycji (*SKOR2* 3000A>T). Podobnie w pozycji 3017 zamiast adeniny wykryto guaninę (*SKOR2* 3017A>G).

W badaniach Browne i Freeman (2024) określili, że NGS, z racji swojej zdolności do jednoczesnej analizy wielu sekwencji DNA, może wykrywać rzadkie warianty, których metoda Sangera nie jest w stanie zidentyfikować z tą samą czułością, skalowością i szybkością. Mamanova i wsp. (2010) podkreślają, że NGS umożliwia wykrycie wariantów niskiej częstotliwości w dużej liczbie próbek, co jest szczególnie istotne w badaniach nad rzadkimi mutacjami somatycznymi. Z kolei metoda Sangera mimo, iż jest powszechnie uważana za „złoty standard” w sekwencjonowaniu, jest mniej czuła niż NGS, szczególnie w przypadku wykrywania mutacji o niskiej częstotliwości. (Arsenic i wsp., 2015).

Kolejną różnicą między tymi metodami jest możliwość detekcji złożonych zmian strukturalnych. Metoda Sangera jest ograniczona do sekwencjonowania pojedynczych fragmentów o stosunkowo niewielkiej długości, co utrudnia analizę złożonych rearanżacji genomowych. Natomiast NGS, dzięki swojemu masowemu charakterowi, potrafi dokładniej mapować zmiany strukturalne, takie jak duplikacje, delecje oraz translokacje (Goodwin i wsp., 2016). W badaniach nad genomem człowieka udowodniono, że NGS może zidentyfikować duże insercje i delecje, które były niewidoczne dla metody Sangera (Schwarz i wsp., 2010). Pomimo swojej wyższej czułości, NGS ma swoje ograniczenia. Wysokoprzepustowe technologie sekwencjonowania mogą generować błędy, szczególnie w regionach bogatych w pary GC, co prowadzi do fałszywie pozytywnych wyników (Ross i wsp., 2013). W takich przypadkach metoda Sangera jest bardziej niezawodna, gdyż dostarcza dokładnych wyników dla specyficznych regionów DNA, szczególnie w analizie polimorfizmu pojedynczych nukleotydów (SNP).

Metoda Sangera charakteryzuje się wysoką dokładnością w analizie krótkich fragmentów DNA, co sprawia, że jest preferowana w wielu badaniach klinicznych, gdzie wymagana jest wysoka precyzja (Heather i Chain, 2016). Z tego powodu, metodę Sangera często stosuje się do potwierdzania wyników uzyskanych za pomocą NGS. W tym kontekście istnieje konsensus, że NGS jest idealnym narzędziem do wstępnych analiz dużej ilości danych, podczas gdy metoda Sangera może być wykorzystana do walidacji wybranych wyników, co zapewnia wyższy poziom wiarygodności. W badaniach Baudhuin i wsp. (2015) wykorzystali metodę sekwencjonowania Sangera do potwierdzania wyników uzyskanych za pomocą NGS. Unikalne warianty wykryte metodą NGS, a więc 1080 jednonukleotydowych wariantów SNV (ang. *single nucleotide variations*) i 124 zmiany typu indele (ang. *insertion-deletion*), zostały zweryfikowane metodą Sangera i porównane z danymi z 1000 Genomes Project (1000G). Powtarzające się warianty w niespokrewnionych próbkach zaowocowały 919 porównaniami między NGS i metodą Sanger, ze 100% zgodnością. W drugim porównaniu, 762 unikalne

wyniki NGS (736 SNV, 26 indeli) z siedmiu próbek 1000G wykazały zgodność 97,1% z danymi 1000G fazy 1. Sekwencjonowanie Sangera i dane fazy 3 1000G potwierdziły dokładność wyników NGS dla wszystkich rozbieżności fazy 1 1000G. Analiza potwierdzająca za pomocą sekwencjonowania Sangera SNV wykrytych za pomocą testów NGS opartych na wychwytywaniu, które spełniają odpowiednie progi jakości, jest zbędna. W przeciwieństwie do tego, stwierdzili oni, że sekwencjonowanie Sangera dla indeli może być niezbędne do określenia prawidłowej lokalizacji genomowej, a Sanger może być wykorzystywany do celów zapewnienia jakości (Baudhuin i wsp., 2015). Pomimo bardzo dużej ilości generowanych wyników uzyskanych metodą NGS, nie ma 100% zgodności z wynikami uzyskanymi metodą Sangera. Jak podają Beck i Mullikin (2016) spośród ponad 5800 odczytów pochodzących z NGS, 19 nie zostało potwierdzonych przez dane Sangera. Autorzy ci uzyskali wskaźnik walidacji na poziomie 99,965%.

Sekwencjonowanie metodą Sangera, pomimo swojej precyzji, jest bardziej czasochłonne i kosztowne w analizie dużych fragmentów genomu. W porównaniu do NGS, który umożliwia równoczesne sekwencjonowanie wielu genów lub nawet całych genomów, metoda Sangera jest mniej efektywna kosztowo przy analizie dużych zestawów danych (Pareek i wsp., 2011).

Niektórzy badacze, tacy jak Smith i wsp. (2016), argumentują, że metoda Sangera, mimo swoich ograniczeń, powinna nadal być uznawana za główną metodę w badaniach klinicznych z powodu jej dokładności i precyzji. Inni natomiast, tacy jak Wang i wsp. (2014), podkreślają przewagę NGS w badaniach o charakterze przesiewowym oraz w analizie dużych populacji genetycznych. W tym kontekście wydaje się, że najlepszym podejściem jest zastosowanie hybrydowej strategii, gdzie NGS dostarcza szerokiego obrazu genetycznego, a metoda Sangera służy do walidacji i potwierdzania krytycznych wyników.

Podsumowując, obie metody sekwencjonowania mają swoje mocne i słabe strony. NGS oferuje ogromne możliwości w zakresie analizy dużych zestawów danych i identyfikacji złożonych wariantów genetycznych, natomiast metoda Sangera, pomimo ograniczeń w zakresie przepustowości, pozostaje niezastąpiona w kontekście wysokiej precyzji i dokładności w specyficznych przypadkach. Optymalne wykorzystanie obu technologii w sposób komplementarny wydaje się najlepszym podejściem w nowoczesnych badaniach genomowych. Pomimo ewidentnych zalet metod wysokoprzepustowych, należy pamiętać o możliwości wystąpienia błędów, które należało by weryfikować poprzez sekwencjonowanie klasyczną metodą terminacji łańcucha. Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że metoda Sangera nadal pozostaje złotym standardem w zakresie sekwencjonowania DNA.

Założenie, że występujące polimorfizmy wpływają na efekt funkcjonalny kodowanych białek, prowadząc do potencjalnych zmian w ich strukturze lub funkcji, było weryfikowane w oparciu o analizę macierzy substytucji w programie SNAP2. W badaniach własnych stwierdzono zamianę aminokwasu seryny na izoleucynę w białku SRSF5, co miało wpływ na jego właściwości i strukturę. Podstawienie aminokwasu o innych właściwościach fizykochemicznych może wpływać na aktywność całego peptydu (Kowalczyk i wsp., 2018). Seryna, będąca niewielkim, polarnym aminokwasem, wyróżnia się obecnością grupy hydroksylowej w swoim łańcuchu bocznym. Właściwości hydrofilowe umożliwiają serynie uczestnictwo w tworzeniu wiązań wodorowych, co odgrywa kluczową rolę w oddziaływaniach typu białko-białko oraz stabilizacji struktury trzeciorzędowej białek. Ponadto, grupa hydroksylowa seryny stanowi potencjalne miejsce fosforylacji, proces katalizowany przez kinazy, który ma fundamentalne znaczenie dla regulacji funkcji białek, wpływając na ich aktywność, lokalizację komórkową i interakcje z innymi cząsteczkami (Cohen, 2002; Wang i Burge, 2008). Izoleucyna, jako obojętny aminokwas, wykazuje preferencję do lokalizowania się w rdzeniach hydrofobowych białek, gdzie nie istnieje bezpośrednie narażenie na kontakt z wodnym środowiskiem. Obecność izoleucyny w tych regionach może istotnie wpłynąć na lokalną strukturę białka, stabilizując ją poprzez oddziaływania hydrofobowe. Ponadto, wprowadzenie izoleucyny może modulować interakcje białka z innymi cząsteczkami, zarówno przez zmianę jego powierzchni hydrofobowej, jak i przez wpływ na konformację białka, a pośrednio także na jego funkcje biologiczne (Kyte i Doolittle, 1982).

Na podstawie właściwości aminokwasów można przypuszczać, że mutacja p.S229I zlokalizowana w domenie bogatej w serynę i argininę, może znacząco wpłynąć na strukturę, stabilność oraz funkcję białka SRSF5. Zmiana polarnego charakteru seryny na hydrofobowy charakter izoleucyny może wprowadzić zmiany w rozpuszczalności oraz lokalne zakłócenia w strukturze białka, co może mieć dalsze konsekwencje dla jego funkcji. Jeżeli pozycja 229 znajduje się na powierzchni białka, mutacja ta mogłaby zakłócić jego interakcje z innymi cząsteczkami, takimi jak kwasy nukleinowe czy inne białka.

Substytucja seryny izoleucyną może mieć daleko idące konsekwencje dla funkcji białka, zwłaszcza w kontekście regulacji alternatywnego splicingu i posttranslacyjnych modyfikacji. SRSF5, będący kluczowym czynnikiem w procesie alternatywnego splicingu, rozpoznaje i wiąże się z miejscami splicingowymi w pre-mRNA, a jakkolwiek zmiana w strukturze białka, w tym substytucja seryny na izoleucynę, może zakłócić jego zdolność do efektywnego oddziaływania z mRNA (Li i wsp., 2021). W rezultacie może dochodzić do

nieprawidłowego splicingu i wytwarzania dysfunkcyjnych izoform białek (Stanford i wsp., 2005). Ponadto seryna pełni rolę kluczowego miejsca fosforylacji, będącej jedną z najważniejszych modyfikacji posttranslacyjnych regulujących aktywność, lokalizację oraz interakcje białek. Fosforylacja seryny odgrywa istotną rolę w procesach sygnalizacji komórkowej i regulacji enzymatycznej. Zastąpienie seryny izoleucyną, która nie posiada grupy hydroksylowej niezbędnej do fosforylacji, skutkuje utratą tego mechanizmu regulacyjnego, co może prowadzić do zaburzenia homeostazy komórkowej i dysfunkcji białka, wpływając na jego aktywność, a także interakcje z innymi molekułami (Cohen, 2000).

Polimorfizm w genie *SRSF5* u norki amerykańskiej (*Neogale vison*), zmieniający zasadę z guaniny na tyminę w pozycji 916 (916G>T), co skutkuje substytucją seryny na izoleucynę w pozycji 229 białka (p.S229I), jest odkryciem, które poszerza naszą wiedzę na temat funkcji tego genu w organizmach norki amerykańskiej. Gen *SRSF5* koduje u człowieka bogaty w serynę i argininę czynnik splicingowy 5. W nomenklaturze ludzkich genów jest znany także jako *HRS* lub *SRP40*. U ludzi gen *SRSF5* znajduje się na dłuższym ramieniu 14. chromosomu, w pozycji 14q24.1 (Varsome, 2024a). Gen *SRSF5* u *Homo sapiens* pełni istotną rolę w procesie alternatywnego splicingu, który jest niezbędny do regulacji różnorodności białek oraz funkcji komórek. Alternatywny splicing kontrolowany przez białka z rodziny SR (*Serine/Arginine-rich*), do których należy białko SRSF5, odpowiada za precyzyjne zarządzanie ekspresją genów i adaptację na poziomie transkryptomu w odpowiedzi na różne sygnały środowiskowe i wewnątrzkomórkowe. Polimorfizmy w genach kodujących białka z rodziny SR, w tym SRSF5 u człowieka, były wcześniej wiązane z różnorodnymi stanami patologicznymi. Xiong i wsp. (2022) dowodzą, że warianty w genie *SRSF5* mogą wpływać na rozwój raka płaskonabłonkowego jamy ustnej (OSCC). Nadekspresja *SRSF5* sprzyja podziałom komórkowym fibroblastów i powstawaniu guzów u myszy, natomiast jej zmniejszenie hamuje wzrost nowotworu. Co ciekawe, inne białko z rodziny białek SR – SRSF3 – także ulegające silniejszej ekspresji w OSCC, wpływa na działanie SRSF5, co skutkuje zwiększoną ilością pełnej formy tego białka w komórkach nowotworowych. Te odkrycia sugerują, że mechanizmy związane ze splicingiem RNA, w których biorą udział SRSF5 i SRSF3, mogą być istotne dla rozwoju OSCC i stanowić potencjalne cele terapii nowotworowej. Z kolei Chen i wsp. (2022) stwierdzili, że białka SR bogate w serynę i argininę, w tym SRSF1 i SRSF5, są kluczowymi regulatorami splicingu czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego A (VEGFA) i modulują różne procesy biologiczne związane z nowotworzeniem, jak przerzuty i angiogeneza. SRSF5 poprzez uczestnictwo w alternatywnym splicingu pre-mRNA, co pozwala

na generowanie kilku form mRNA z jednego genu, tworzy proangiogenne, a tym samym onkogenne izoformy czynnika VEGFA.

Natomiast Han i wsp. (2020) stwierdzili, że dysfunkcja w mechanizmach splicingu jest skorelowana z chorobami neurodegeneracyjnymi, takimi jak choroba Alzheimera, gdzie zaburzenia na poziomie alternatywnego splicingu mogą prowadzić do nieprawidłowego funkcjonowania komórek. Do podobnych konkluzji doszli Yang i wsp. (2018), że dla wielu białek SR, które są bogate w sekwencje serynowo-argininowe, zmiany w składzie aminokwasowym mogą zakłócać ich interakcje z innymi elementami splicingu i tym samym wpływać na splicing całkowity lub specyficzny dla niektórych tkanek. Ponadto, rola białka SRSF5 dla organizmu człowieka obejmuje nie tylko splicing, ale również udział w eksporcie mRNA z jądra komórkowego do cytoplazmy, co sugeruje, że jakiegokolwiek zmiany strukturalne mogą mieć szeroko pojęte konsekwencje w ekspresji genów (Botti i wsp., 2017).

Według Wagner i Frye (2021) czynniki splicingowe z rodziny białek bogatych w serynę/argininę (SR), do których należy białko kodowane przez analizowany gen *SRSF5*, odgrywają wszechstronną rolę w przetwarzaniu RNA i często są niezbędne dla prawidłowego rozwoju. Większość białek SR przemieszcza się między cytoplazmą a jądrem. Natomiast SRSF2 i SRSF5 są zatrzymywane w jądrze. Autorzy ci stwierdzili, że białka SR ułatwiają eksport mRNA w sposób specyficzny dla stanu komórki (Wagner i Frye, 2021; Ratnadiwakara i wsp., 2018).

Podjęto próbę oceny, czy zamiana aminokwasu argininy (Arg, R) na lizynę (Lys, K) w pozycji 199 białka RNF165 (p.R199K) może wywierać wpływ na jego właściwości fizykochemiczne i strukturę. Białko RNF165 jest ligazą ubikwitynową, która odgrywa kluczową rolę w regulacji degradacji białek poprzez system ubikwityna-proteasom, a także uczestniczy w licznych procesach sygnalizacyjnych komórki (Kelly i wsp., 2013).

Zarówno arginina (R), jak i lizyna (K) są aminokwasami zasadowymi, które mają dodatni ładunek przy fizjologicznym pH. Dzięki temu oba aminokwasy mogą uczestniczyć w podobnych oddziaływaniach elektrostatycznych, zwłaszcza z ujemnie naładowanymi grupami fosforanowymi lub resztami kwasowymi w białkach i kwasach nukleinowych. Niemniej jednak, różnice w ich strukturze łańcuchów bocznych może wpłynąć na lokalną architekturę białka. Arginina posiada bardziej złożoną grupę guanidynową, która umożliwia tworzenie trwalszych wiązań wodorowych i bardziej rozbudowanych oddziaływań elektrostatycznych niż prostsza struktura grupy aminowej lizyny. Zamiana argininy na lizynę może więc zmniejszyć

liczbę wiązań wodorowych lub elektrostatycznych, co może wpływać na stabilność białka w lokalnym środowisku, zwłaszcza jeśli pozycja 199 znajduje się w kluczowej domenie funkcjonalnej.

Struktura trzeciorzędowa białka jest krytyczna dla jego funkcji. Arginina, dzięki swojej zdolności do tworzenia bardziej rozbudowanych interakcji, może stabilizować struktury helikalne lub beta-harmonijki, podczas gdy lizyna, choć posiada podobny ładunek, może mniej efektywnie stabilizować te struktury. W białku RNF165 zamiana R na K w pozycji 199 może prowadzić do lokalnych zmian w strukturze trzeciorzędowej, zwłaszcza jeśli ta pozycja znajduje się w pobliżu kluczowych domen strukturalnych lub funkcjonalnych, takich jak domena RING ligazy ubikwityny. Takie zmiany mogą wpłynąć na sposób wiązania białka z jego substratami lub partnerami białkowymi, co może osłabić wydajność katalizy procesu ubikwitynacji.

Zmiana p.R199K może wpływać na zdolność białka RNF165 do pełnienia funkcji ligazy ubikwityny, która odpowiada za przyłączanie łańcuchów ubikwityny do substratów białkowych, co inicjuje ich degradację w proteasomach. Jak podaje Kelly i wsp. (2013) zmiany mogą zaburzać wiązanie i zmniejszać efektywność enzymatyczną ligazy ubikwitynowej. Wnioskować można, że zmiana p.R199K gdyby dotyczyła regionu zaangażowanego w interakcje z substratami, mogłaby wpływać na procesy sygnalizacyjne zależne od ubikwitynacji, takie jak odpowiedź na stres oksydacyjny, regulacja cyklu komórkowego czy kontrola degradacji białek regulujących apoptozę. Jak podaje Żmuda i wsp. (2022) wybuch tlenowy (ang. *oxidative burst*), polegający na nagłym uwolnieniu reaktywnych form tlenu (ROS, *Reactive Oxygen Species*) przez makrofagi i neutrofile w odpowiedzi na kontakt z różnego rodzaju patogenami odgrywa istotną rolę w odporności naturalnej. Może jednak powodować także dodatkowe uszkodzenie tkanek żywiciela. W przypadku choroby aleuckiej nerek Davies (2000) wskazał produkcję ROS jako kluczową reakcję zachodzącą w fagocytach w celu degradacji cząstek wirusa. Zaobserwował również obniżenie fagocytozy i metabolizmu tlenowego granulocytów i monocytów. Allen i Tresini (2000) stwierdzili, że reaktywne formy tlenu wchodząc w reakcje z DNA i białkami prowadzą do uszkodzenia tkanek. Pomimo działań niekorzystnych reaktywnych form tlenu, uczestniczy on również w szlakach sygnałowych i procesie regulacji genów (Lambeth i wsp. 2007; Powers i Jackson 2008; Schieber i Chandel 2014). Jak podaje Huntoon i wsp. (2008) reaktywne formy tlenu odgrywają kluczową rolę w procesie odporności wpływając na aktywację odpowiedzi immunologicznej poprzez udział w

szlakach sygnałowych.

Jedną z funkcji białka RNF165, poza enzymatyczną jako transferaza, katalityczną, działającą na białko, udziałem w sygnalizacji oraz różnicowaniu komórek, jest aktywność receptora wirusa (UniProt, 2024b). W związku z tym polimorfizm p.R199K może mieć wpływ na modyfikacje aktywności białka RNF165 jako receptora dla wirusa AMDV. Zmiana ta może również wpłynąć na stabilność samego białka RNF165, ponieważ zmiany w strukturze mogą prowadzić do niestabilności białka i zwiększonej podatności na degradację. Jeśli destabilizacja białka w wyniku mutacji prowadzi do jego szybszej degradacji, mogłoby to mieć negatywne konsekwencje dla funkcji komórki, np. w kontekście zaburzeń homeostazy białkowej, które mogą sprzyjać rozwojowi chorób neurodegeneracyjnych lub nowotworowych. Jak donosi Kelly i wsp. (2013) gen *RNF165* (*Ark2C*) ulega ekspresji specyficznemu w układzie nerwowym oraz jego utrata u myszy powoduje wady neuronów ruchowych, które powstają podczas rozwoju i prowadzą do wyniszczenia i śmierci przed odsadzeniem.

Zamiana aminokwasu argininy na lizynę w pozycji 199 (p.R199K) w białku RNF165 prowadzi do zmiany w jego właściwościach fizykochemicznych, co może mieć konsekwencje dla stabilności lokalnej struktury białka oraz jego funkcji. Choć zarówno lizyna, jak i arginina są aminokwasami zasadowymi, różnice w ich zdolnościach do tworzenia interakcji wodorowych mogą prowadzić do zmian w strukturze trzeciorzędowej białka RNF165, co z kolei może wpływać na jego zdolność do pełnienia funkcji ligazy ubikwityny. Skutki tej mutacji mogą obejmować obniżenie efektywności katalitycznej, destabilizację białka oraz zaburzenia w regulacji szlaków sygnalizacyjnych zależnych od ubikwitynacji (UniProt, 2024a).

Z podobnymi zmianami mamy do czynienia w przypadku białka SKOR2. Substytucja p.1000K>N występuje u wszystkich osobników nerek (hodowlanych i dziko żyjących) w porównaniu z sekwencją referencyjną. W tej pozycji zaszła zmiana zasadowej lizyny (K) na polarną, asparaginę (N). Substytucja p.H1006R jest obecna wyłącznie u osobnika 5_Ex.1-7. Zmiana ta polega na substytucji histydyny (H), reszty aromatycznej, na argininę (R), zasadową resztę o dodatnim ładunku. Zmiany te mogą potencjalnie wpływać na funkcje białka SKOR2.

W badaniu sekwencji genu *SKOR2* wykryto mutację punktową p. 1000K>N, która polega na substytucji AGA trójki kodującej aminokwas lizynę (K) na TGA, czyli kodon dla asparaginy (N) w pozycji 1000. Lizyna (K) jest aminokwasem zasadowym, który posiada dodatni ładunek w warunkach fizjologicznych i odgrywa istotną rolę w interakcjach z innymi

cząsteczkami białkowymi oraz kwasami nukleinowymi, głównie poprzez tworzenie wiązań jonowych i oddziaływań elektrostatycznych. Z kolei asparagina (N) jest aminokwasem polarnym, ale nie posiada ładunku elektrycznego. Substytucja lizyny na asparaginę może znacząco wpłynąć na strukturę trzeciorzędową białka, zwłaszcza w rejonach, gdzie lizyna uczestniczyła w kluczowych interakcjach. Przewidywane skutki tej mutacji obejmują potencjalne zakłócenia stabilności białka oraz zmianę konformacji lokalnych struktur. W zależności od lokalizacji pozycji 1000 w strukturze białka SKOR2, zmiana ta może wpłynąć na jego zdolność do oddziaływań z innymi molekułami, takich jak ligandy, białka regulatorowe czy kwasy nukleinowe.

W badaniach nad genem kodującym podjednostkę alfa ludzkiego receptora insuliny Kadowaki i wsp. (1990) stwierdzili, że substytucja lizyny asparaginą w pozycji 15 wpływa na funkcje białka. Zidentyfikowali oni u pacjenta z genetyczną postacią insulinooporności zmutowany allel kodujący receptor insuliny, w którym lizyna jest zastąpiona asparaginą w pozycji 15 podjednostki alfa. Mutacja K15N powoduje dwa defekty w funkcjonowaniu tego białka. Po pierwsze, mutacja opóźnia potranslacyjne przetwarzanie receptora i upośledza transport receptora do błony plazmatycznej, zmniejszając w ten sposób liczbę receptorów na powierzchni komórki. Po drugie, mutacja powoduje 5-krotne zmniejszenie powinowactwa receptora do wiązania insuliny. Te dwa defekty łączą się, czyniąc komórkę docelową odporną na normalne fizjologiczne stężenia insuliny (Kadowaki i wsp., 1990).

Białko SKOR2 (korepresor transkrypcyjny 2 z rodziny SKI) (UniProt, 2024b) występuje w jądrze komórkowym oraz w kompleksach regulatora transkrypcji. Spełnia w komórce trzy funkcje: oddziałując na aktywność czynnika transkrypcyjnego wiążącego DNA, specyficznego dla polimerazy RNA II oraz wiążąc DNA specyficznie dla sekwencji regionu cis-regulacyjnego polimerazy RNA II, a także wiązanie białek SMAD (UniProt, 2024c). Jak podają Macias i wsp. (2015) rodzina tych białek będących czynnikami transkrypcyjnymi jest również zaangażowana w przekaznictwo sygnału indukowanego przez produkowaną przez leukocyty grupę cytokin TGF- β (transformujący czynnik wzrostu beta, ang. *transforming growth factor* β). Substytucja K>N w pozycji 1000 białka SKOR2 może wpłynąć na zmianę aktywności enzymatycznej lub transportowej. Jeśli lizyna w tej pozycji jest kluczowa dla funkcji transportowej białka, jej zamiana na asparaginę może obniżyć efektywność wiązania substratów lub ich przenoszenia. Podobny efekt substytucji K>N opisali Kadowaki i

wsp. (1990), którzy stwierdzili, iż zmiana ta w ludzkim receptorze insuliny prowadzi do upośledzenia jego transportu do błony plazmatycznej i wiązania insuliny jako substratu.

Zmniejszenie zdolności wiązania z innymi białkami lub ligandami – ładunek dodatni lizyny umożliwia interakcje z ujemnie naładowanymi resztami białek czy kwasów nukleinowych. Jego zastąpienie obojętnym ładunkiem asparaginy może osłabić te interakcje, co może wpływać na zdolność białka do tworzenia kompleksów białkowych lub na jego stabilność. Substytucja K>N wpływa na lokalizację komórkową białka, co może wynikać ze zmiany jego funkcji transportowej czy regulacyjnej.

Zmiana w strukturze i funkcji białka SKOR2 może mieć bezpośredni wpływ na procesy fizjologiczne, w których uczestniczy. W przypadku organizmów zwierzęcych, białka z rodziny SKI mogą wpływać na funkcje komórek nerwowych, mięśniowych czy transport substancji w nerkach. Zgodnie z informacjami zawartymi w bazie danych MGI (Mouse Genome Informatics) dla modelu mysiego białko SKOR2 odpowiada również za różnicowanie komórek, proliferację populacji komórek, organizację składników komórkowych, transkrypcję wzorowaną na DNA, odpowiedź na bodziec, a także rozwój systemu sygnalizacyjnego (MGI, 2024a). Chen i wsp. (2024) stwierdzili, że rodzina białek SKI pełniąc funkcje represorów transkrypcji tłumi sygnalizację TGF- β poprzez kompleksowanie z białkiem SMAD4 i rekrutację dodatkowych represorów w celu hamowania innych szlaków sygnałowych za pośrednictwem TGF- β . Wyniki badań tych autorów sugerują, że utrzymująca się ekspresja białek SKI w mikrośrodowisku guza zwiększyła odporność przeciwnowotworową i wyniki przeżycia w modelach mysich (Chen i wsp., 2024).

Podjęto próbę zweryfikowania hipotezy, że mutacje zidentyfikowane w genach *SKOR2*, *SRSF5* oraz *RNF165* mogą być związane z podwyższoną odpornością lub zwiększoną podatnością nerek na zakażenie wirusem choroby aleuckiej nerek (AMDV). W przeprowadzonych badaniach stwierdzono miejsca polimorficzne w genach *SRSF5*, *RNF165* oraz *SKOR2*. Mutacje typu SNP stwierdzone zarówno u nerek hodowlanych, jak i dzikich, w badanych genach sugerują, że poszczególne fenotypy mogą wpływać na różnice w odporności lub podatności na zakażenie wirusem AMD. W badaniach Karimi i wsp. (2021a) podkreślają, że wirus AMDV, będący patogenem przede wszystkim nerek amerykańskich, ma szczególny wpływ na układ odpornościowy, a niektóre geny mogą odgrywać istotną rolę w odpowiedzi immunologicznej na zakażenie. Wskazali oni, że mutacje w genie *SRSF5* mogą być potencjalnymi wskaźnikami do selekcji nerek amerykańskich wykazujących tolerancję na

zakażenie AMDV.

Zidentyfikowane w badaniach własnych mutacje *SRSF5* (173A>C, 758ins.T oraz 916G>T), wykryte wyłącznie u nerek hodowlanych, mogą sugerować, że te polimorfizmy wpływają na różnice w podatności na chorobę aleucką. Gen *SRSF5* koduje białko należące do rodziny SR, charakteryzujące się obecnością bogatych w serynę i argininę domen, które pełnią kluczową rolę w regulacji splicingu pre-mRNA (Breig i Baklouti, 2013; Karimi i wsp., 2021a). Mutacje w obrębie genu *SRSF5* poprzez posttranskrypcyjną regulację ekspresji genów, wpływają na prawidłowe funkcjonowanie komórek oraz odpowiedź na infekcje wirusowe. Bogaty w serynę i argininę czynnik splicingowy 5 pełni istotne funkcje, nie tylko w odpowiedzi na infekcje wirusowe, ale także w rozwoju i funkcjonowaniu różnych tkanek. Karimi i wsp. (2021a) wykazali, w badaniach na modelach zwierzęcych, że gen ten odgrywa kluczową rolę w regeneracji wątroby poprzez indukcję białek odpowiedzialnych za proliferację komórek wątroby. Ma to szczególne znaczenie w kontekście regeneracji narządów po przejściu stanów chorobowych. Również w przypadku infekcji AMDV u nerek mamy do czynienia z niekorzystnym oddziaływaniem stresu oksydacyjnego poprzez uszkodzenia białek, lipidów, DNA i węglowodanów (Żmuda i wsp., 2022). Polimorfizmy zidentyfikowane w badaniach własnych w genie *SRSF5* mogą mieć potencjalny wpływ na różnice w zdolności do regeneracji wątroby po zmianach wywołanych infekcją wirusem AMDV w tym narządzie.

Caputi i wsp. (2004) powiązali funkcjonowanie genu *SRSF5* z regulacją splicingu mRNA wirusa HIV-1 u człowieka, co podkreśla jego rolę w odpowiedzi organizmu na infekcje wirusowe. Jak podaje Swanson i wsp. (2010) białko będące produktem ekspresji genu *SRSF5*, wspomaga translację niesplicingowanego RNA wirusa HIV-1, umożliwiając mu replikację i rozprzestrzenianie się w organizmie. Ta funkcja w kontekście innych wirusów sugeruje, że *SRSF5* może pełnić podobną rolę w reakcji organizmu nerek na zakażenie AMDV. Może to wskazywać, że mutacje występujące w tym genie mogą wpływać na szybsze namnażanie i rozprzestrzenianie się wirusa w zainfekowanym organizmie.

W badaniach dotyczących innych chorób metabolicznych i zapalnych, gen *SRSF5* był powiązany z procesami regulacyjnymi związanymi z odpowiedzią na insulinę oraz regeneracją tkanek (Breig i Baklouti, 2013). Może to sugerować, że warianty w tym genie mogą wpływać na podatność na różne schorzenia związane z metabolizmem, w tym na reakcje zapalne, co jest obserwowane w przypadku objawów klinicznych charakterystycznych dla choroby aleuckiej. Jak podaje Rifai (1987) w przebiegu choroby aleuckiej objawiającej się zapaleniem śródmiąższowym nerek i zapaleniem kłębuszków nerkowych dochodzi do uszkodzenia nerek. Te zmiany wynikają z nacieku plazmocytów do nerek, odkładania się kompleksów

immunologicznych i zmian spowodowanych replikacją wirusa AMD w komórkach nabłonka kanalików nerkowych, torebce Bowmana i kłębuszkach nerkowych. W badaniach Suzuki i Tomino (2008) choroba aleucka nerek jest uważana za zwierzęcy model infekcyjnego zapalenia nerek u człowieka, przebiegającego z hiperglobulinemią IgA. Również zapalenie wątroby zostało wskazane przez Valdovska i Pilmane (2011) oraz przez Jensen i wsp. (2015) jako jeden z objawów AD u dorosłych nerek, będący skutkiem plazmocytozy. Reakcje zapalne w przebiegu ostrej postaci choroby aleuckiej u nerek były raportowane także w płucach (Larsen i wsp., 1984; Alexandersen i wsp., 1986; Jensen i wsp., 2015), w tętnicach (Porter i wsp., 1973) i oponach mózgowo-rdzeniowych (Jensen i wsp., 2015). W chorobie aleuckiej nerek w zmianach i zaburzeniach, kluczową rolę odgrywa nadmierna proliferacja limfocytów B i wzmożona produkcja przeciwciał czego ostatecznym następstwem jest choroba autoimmunologiczna (Aasted i Leslie 1991, Porter i wsp. 1980). Zidentyfikowane polimorfizmy w genie *SRSF5* u nerek hodowlanych mogą nie tylko wpływać na reakcję na zakażenie AMDV, ale także na funkcje metaboliczne, immunologiczne oraz regeneracyjne organizmu. Wpływ tych mutacji na różne szlaki biologiczne, w tym odpowiedź immunologiczną i regenerację tkanek, wskazuje na potrzebę dalszych badań, które pozwolą lepiej zrozumieć ich rolę w odpowiedzi na chorobę aleucką.

Kolejnym genem badanym pod kątem odpowiedzi immunologicznej na infekcję wirusa AMD był *RNF165*. Martino i wsp. (2012) stwierdzili, że gen *RNF165* koduje białko biorące udział w epigenetycznym programowaniu fenotypów limfocytów T, co ma istotne znaczenie w odpowiedzi immunologicznej u ludzi. Limfocyty T są istotnymi komórkami układu odpornościowego, odpowiadającymi za rozpoznawanie i eliminowanie zainfekowanych komórek oraz patogenów, w tym wirusów. Zmiany w epigenetycznej regulacji fenotypów limfocytów T mogą wpływać na efektywność odpowiedzi immunologicznej. W przeprowadzonych badaniach zidentyfikowano polimorfizmy *RNF165* (141A>G, 596A>G) u nerek hodowlanych i dzikich, co sugeruje, że zmiany te mogą mieć wpływ na reakcję organizmu nerek na obecność wirusa AMDV poprzez wpływ na funkcjonowanie limfocytów T. Według Martino i wsp. (2012) gen *RNF165* reguluje wczesne etapy programowania limfocytów T, toteż wykryte zmiany w jego sekwencji mogą wpływać na rozwój różnych podtypów limfocytów, a tym samym na zdolność organizmu do skutecznej odpowiedzi na infekcję wirusową. Jak podają Markarian i Abrahamyan (2021), wirus AMDV po wnikięciu do organizmu ulega ciągłej i intensywnej replikacji. Wykazuje on tropizm szczególnie do tkanki limfoidalnej, a głównymi komórkami docelowymi u nerek dorosłych są limfocyty B i T. Aasted (1989) w badaniach układu leukocytnego w chorobie aleuckiej nerek, wykazał ponad

dwukrotny wzrost ilości limfocytów T o fenotypie CD8+. Natomiast wg tego badacza liczba limfocytów B i limfocytów Th we krwi obwodowej nie ulega istotnym zmianom (Aasted 1989). Ciągła replikacja wirusa stymuluje nadmierne wydzielanie specyficznych przeciwciał przez układ odpornościowy, a także uogólnioną plazmacytozę i gammadacie monoklonalne (Reichert i Kostro, 2014b). Jak podają Chen i Aasted (1998) u nerek podczas infekcji wirusem AMDV obserwuje się hipergammaglobulinemię w surowicy wraz z podwyższoną odpowiedzią przeciwciał na białka NS1 i VP1/2 wirusa oraz znaczny wzrost liczby limfocytów CD8+ we krwi. Podobne zmiany zaobserwowano w krezkowych węzłach chłonnych i śledzionie. Autorzy Ci stwierdzili u ciężko zakażonych nerek struktura grasicy zanikła a komórki CD3+ znajdowały się w całym narządzie. Panicz i wsp. (2021) podają, że rozmiar śledziony, pełniący ważne funkcje immunologiczne, był powszechnie stosowany do oceny odpowiedzi immunologicznej na różne czynniki (John, 1994; Schulte-Hostedde i wsp., 2012). W badaniach tych autorów norki zakażone AMDV miały znacznie wyższy stosunek masy śledziony do masy ciała. Powiększenie śledziony było najprawdopodobniej spowodowane obecnością patogenu, co oznacza, że narządy odpornościowe były w stanie wysokiej aktywacji i wytwarzana była zwiększona liczba limfocytów, głównie limfocytów T (Abolins i wsp., 2017). Powiększenie śledziony u nerek zakażonych AMDV jest zgodne z wcześniejszymi ustaleniami Reicherta i Kostro (2014b). W badaniach Persson i wsp. (2015) stwierdzono różnicę we względnej masie śledziony u samców wolno żyjących nerek amerykańskich, natomiast nie stwierdzono różnic u samic.

Obecność tych samych polimorfizmów genu *RNF165* w obu grupach nerek, niezależnie od ich stanu zdrowia, może sugerować, że wpływ tych mutacji na kliniczny przebieg choroby jest bardziej skomplikowany i zależy od interakcji z innymi czynnikami genetycznymi lub środowiskowymi. Mutacje *RNF165* mogą być markerem związanym z odpornością, ale różnice w reakcjach immunologicznych między norkami hodowlanymi i dzikimi mogą wynikać ze współdziałania czynników genetycznych i środowiskowych oraz interakcji między nimi. Aby w arbitralny sposób stwierdzić, w jaki sposób polimorfizmy w genie *RNF165* wpływają na odpowiedź immunologiczną nerek niezbędne są dalsze badania.

Gen *SKOR2* koduje białko należące do rodziny białek SKI, które działają jako negatywne regulatory szlaku sygnałowego TGF- β (Karimi i wsp., 2021a). Utrata sygnalizacji TGF- β została powiązana ze stanami zapalnymi i chorobami autoimmunologicznymi (Karimi i wsp., 2021a), co może mieć istotne znaczenie w przypadku choroby aleuckiej, która wpływa na układ odpornościowy nerek. Jak podaje Kowalczyk i wsp. (2019) oraz Kostro i wsp. (1999). W wyniku intensywnej i ciągłej replikacji AMDV w organizmie zakażonych nerek zostają

zaburzone funkcje układu immunologicznego, polegające na nadmiernej syntezie swoistych przeciwciał, intensywnym rozplemie komórek plazmatycznych i hipergammaglobulinemi. Obecność przeciwciał przeciwwirusowych powoduje powstanie kompleksów immunologicznych, które odkładając się w naczyniach krwionośnych nerek, wątroby i śledziony wywołują stan zapalny tych narządów. Z kolei intensywny rozplem komórek plazmatycznych i wnikanie ich do śledziony, nerek, wątroby i węzłów chłonnych powoduje zmiany morfologiczne i zaburzenia czynnościowe tych narządów. Następstwem tych zaburzeń są zmiany patologiczne w narządach wewnętrznych będące przyczyną licznych padnięć osesków i młodych nerek, a tym samym niskiej opłacalności hodowli związanej z niską średnią miotu.

W przeprowadzonych badaniach zidentyfikowano polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNP) w genie *SKOR2* (3000A>T u nerek hodowlanych oraz dzikich oraz 3017A>G tylko u norki dzikiej). Obecność mutacji 3017A>G wyłącznie u norki dzikiej w kontekście odpowiedzi immunologicznej, może sugerować, że zmiana ta może być związana z naturalną odpornością na wirusa. Populacja nerek dzikich charakteryzuje się niższą liczbą kopii wirusa niż zwierzęta hodowlane, a w związku z tym mogą wykazywać lepszą kontrolę nad stanami zapalnymi wywołanymi infekcją dzięki modyfikacjom w genie *SKOR2*. Różnice w zidentyfikowanych mutacjach między norkami hodowlanymi (uznanymi za próbę badawczą w niniejszych badaniach) i dzikimi (próbą kontrolną) mogą odzwierciedlać różne strategie obronne przeciwko wirusowi AMDV. Norki hodowlane, które zostały wyselekcjonowane w warunkach sztucznej hodowli, mogą wykazywać mutacje wpływające na większą podatność na zakażenie, podczas gdy norki dzikie, które miały kontakt z wirusem w naturalnym środowisku, mogą mieć lepiej rozwinięte mechanizmy odpornościowe. Obecność polimorfizmu 3017A>G wyłącznie u nerek dzikich bez objawów choroby może sugerować, że ten wariant genu *SKOR2* wpływa na lepszą kontrolę nad infekcją wirusową i potencjalnie zwiększoną odporność na wirusa.

Zidentyfikowane mutacje w genach *SRSF5*, *RNF165* oraz *SKOR2* mogą odgrywać istotną rolę w różnicach w podatności lub odporności nerek na zakażenie wirusem AMDV. Mutacje te mogą wpływać na różne aspekty odpowiedzi immunologicznej, rozwój choroby oraz kliniczne objawy zakażenia. W szczególności mutacje w genie *SKOR2* mogą być związane z naturalną odpornością u nerek dzikich, co sugeruje możliwość wykorzystania tej wiedzy w programach hodowlanych mających na celu selekcję zwierząt odpornych na chorobę aleucką. Geny te jak podają Karimi i wsp. (2021a) są kluczowe w odpowiedzi tych zwierząt na infekcje wirusem AMDV. Dalsze badania są jednak niezbędne, aby zrozumieć pełne znaczenie tych

mutacji w mechanizmach obronnych organizmu norek. Można stwierdzić, że uzyskane wyniki badań wykazały, że istnieje zróżnicowanie molekularne w obrębie genów odpowiedzialnych za odpowiedź na choroby wirusowe (*SRSF5*, *RNF165*, *SKOR2*) u norki amerykańskiej. Dotychczas w literaturze światowej nie opisano polimorfizmu molekularnego sekwencji kodujących genów *SRSF5*, *RNF165* oraz *SKOR2* u norek amerykańskich.

6. Podsumowanie i wnioski

W wyniku przeprowadzonych badań sformułowano następujące wnioski:

1. Zsekwencjonowanie metodą Sangera genów *SRSF5*, *RNF165* i *SKOR2* pozwoliło na wskazanie potencjalnych miejsc polimorficznych, które mogą być związane z różnym przebiegiem choroby i odpornością na infekcję wirusem AMDV.
2. Stwierdzono występowanie istotnych różnic w sekwencjach kodujących badanych genów u gatunków należących do rodziny łasicowatych *Mustelidae*.
2. Mutacja o niesynonimicznym charakterze w obrębie genu *SRSF5* 916G>T (p.S229I) została zidentyfikowana jedynie w grupie nerek hodowlanych. Mutacja ta skutkowała zmianą seryny na izoleucynę i dotyczyła trójki nukleotydowej AGT->ATT.
3. W obrębie genu *RNF165* stwierdzono dwa polimorfizmy. Pierwszy w pozycji 141A>G, który nie wpływał na zmianę aminokwasu. Drugi w pozycji 596A>G (p.R199K), będący mutacją typu missens skutkujący zmianą w kodonie AGA->AAA.
4. Stwierdzono występowanie dwóch polimorfizmów w sekwencji kodującej genu *SKOR2*. Miały one charakter niesynonimiczny. Pierwszy z nich w pozycji 3000A>T (p.K1000N)AGA->TGA odpowiadających za kodowanie K i N. Podobny charakter mutacji stwierdzono w przypadku drugiego miejsca polimorficznego - 3017A>G (p.H1006R) skutkującego zmianą trójki nukleotydowej CCA->CCG.
5. Stwierdzono mutację 173A>C w regionie 5'UTR genu *SRSF5*, która nie wpływa bezpośrednio na sekwencję aminokwasów, ale może mieć wpływ na poziom ekspresji genu *SRSF5*.
6. Występuje zróżnicowanie nukleotydowe w obrębie wybranych eksonów trzech badanych genów (*SRSF5*, *RNF165*, *SKOR2*) pomiędzy poszczególnymi osobnikami. Dla genu *SRSF5* była to mutacja w eksonie 1 i 8, dla genu *RNF165* w eksonie 2 i 5, zaś dla genu *SKOR2* w eksonie 7.
7. Stwierdzono zróżnicowanie wyników uzyskanych na podstawie sekwencjonowania wysokoprzepustowego (NGS) z bazy Ensembl a wynikami badań własnych uzyskanych metodą sekwencjonowania Sangera w zakresie analizowanych genów. W obrębie genu *SRSF5* stwierdzono mutacje: transwersję 173A>C, insercję 758ins.T oraz transwersję 916G>T. Dla genu *RNF165* stwierdzono dwie tranzycje: 141A>G oraz 596A>G. Gen *SKOR2* charakteryzował się transwersją 3000A>T oraz tranzycją w pozycji 3017A>G.
8. Określono polimorfizm molekularny genu *SRSF5* z bazy Ensembl z sekwencjami dostępnymi w bazie NCBI będących przewidywaniem metodą GNOMON dla blisko

spokrewnionych gatunków z rodziny łasicowatych. Stwierdzono trzy tranzycje 108G>A, 110A>G, 466G>A oraz dwie transwersje 173A>C oraz 473A>C. W przypadku genu *RNF165* stwierdzono trzy tranzycje (486T>C, 654A>G, 687T>C) oraz jedną mutację typu transwersji 771A>T/C. Gen *SKOR2* charakteryzował się 27 różnicami (21A>G, 72T>C, 403C>A, 450A>G, 471A>T, 576C>T, 579A>G, 582G>C, 597A>G, 603C>G, 609C>A, 642A>G, 855T>C, 1017A>G, 1023C>T, 1096A>G, 1318A>G, 1356A>G, 1467T>G, 1494T>G, 1719G>C, 1914C>A, 2022A>G, 2069A>C, 2292T>C, 2388T>C, 2472T>C, 2748T>G).

9. Występujące polimorfizmy genetyczne wpływając na efekt funkcjonalny kodowanych białek, prowadzą do potencjalnych zmian w ich strukturze lub funkcji. Stwierdzono umiarkowany efekt funkcjonalny polimorfizmu w genie *SRSF5* 916G>T(p.S229I) na uzyskane białko. Dla polimorfizmu *SKOR2* p.K1006 stwierdzono negatywny efekt na białko będące produktem genu *SKOR2*. Natomiast substytucja w obrębie genu *SKOR2* p.H1006R została określona jako neutralna.

10. Polimorfizm *SRSF5* 916G>T p.S229I występujący wyłącznie u nerek hodowlanych został powiązany ze zwiększoną podatnością nerek na zakażenie wirusem AMD z uwagi na niewystępowanie wyżej wymienionej mutacji u nerek dzikich. Mutacja w genie *RNF165* 596A>G p. R199K wymaga dalszych badań z uwzględnieniem powiązania z liczbą kopii wirusa. Stwierdzono występowanie mutacji typu SNP w sekwencji kodującej genu *SKOR2* 3017A>G (p.H1006R) wyłącznie u nerek dzikich. Może to być związane z podwyższoną odpornością tej grupy zwierząt na infekcje wirusem AMD.

7. Bibliografia

- Aasted, B. (1989). Mink infected with Aleutian disease virus have an elevated level of CD8-positive T-lymphocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 20(4), 375-385
[https://doi.org/10.1016/0165-2427\(89\)90082-2](https://doi.org/10.1016/0165-2427(89)90082-2)
- Aasted, B., Viuff, B. (2007). Reactivity of monoclonal antibodies to human CD antigens with cells from mink. *Veterinary immunology and immunopathology*, 119(1-2), 27-37.
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.06.025>
- Aasted, B.E.N.T., Bloom, M. E. (1983). Sensitive radioimmune assay for measuring Aleutian disease virus antigen and antibody. *Journal of Clinical Microbiology*, 18(3), 637-644.
<https://doi.org/10.1128/jcm.18.3.637-644.1983>
- Abolins, S., King, E.C., Lazarou, L., Weldon, L., Hughes, L., Drescher, P., Raynes, J.G., Hafalla, J.C.R., Viney, M.E., Riley, E.M. (2017). The comparative immunology of wild and laboratory mice, *Mus musculus domesticus*. *Nature Communications*, 8, 1-13
<https://doi.org/10.1038/ncomms14811>
- Abramov, A. V. (2000). A taxonomic review of the genus *Mustela* (Mammalia, Carnivora). *Zoosystematica rossica*, 8(2), 357-364.
- Adaszek, Ł., Kutrzuba, J., Kalinowski, M., Garbal, M., Winiarczyk, S. (2012). Przypadki nerwowej postaci nosówki u szczepionych psów – czy można mówić o nowym wariacie wirusa? *Życie Weterynaryjne*, 87(7), s. 597-600
- Aguiló-Gisbert, J., Padilla-Blanco, M., Lizana, V., Maiques, E., Muñoz-Baquero, M., Chillida-Martínez, E., Cardells, J., Rubio-Guerri, C. (2021). First description of SARS-CoV-2 infection in two feral American mink (*Neovison vison*) caught in the wild. *Animals*, 11(5), 1422. <https://doi.org/10.3390/ani11051422>
- Alexandersen, S. (1990). Pathogenesis of disease caused by Aleutian mink disease parvovirus. *APMIS. Supplementum*, 14, 1-32.
- Alexandersen, S., Bloom, M.E., Wolfenbarger, J. (1988). Evidence of restricted viral replication in adult mink infected with Aleutian disease of mink parvovirus. *Journal of Virology*, 62 (5), 1495-1507. <https://doi.org/10.1128/jvi.62.5.1495-1507.1988>
- Alexandersen, S., Larsen, S., Aasted, B., Uttenthal, A., Bloom, M. E., Hansen, M. (1994). Acute interstitial pneumonia in mink kits inoculated with defined isolates of Aleutian mink disease parvovirus. *Veterinary Pathology*, 31(2), 216-228.
<https://doi.org/10.1177/030098589403100209>
- Alexandersen, S., Uttenthal-Jensen, Å., Aasted, B. (1986). Demonstration of non-degraded

- Aleutian disease virus (ADV) proteins in lung tissue from experimentally infected mink kits. *Archives of Virology*, 87, 127-133. <https://doi.org/10.1007/BF01310549>
- Allen, R.G.; Tresini, M. (2000). Oxidative stress and gene regulation. *Free Radical Biology and Medicine*, 28.3: 463-499. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00242-7](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00242-7)
- Andersson, A.M., Wallgren, P. (2013). Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assays for serodiagnosis of Aleutian mink disease virus infection in mink. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 55, 86 (2013). <https://doi.org/10.1186/1751-0147-55-86>
- Anistoroaei, R., Krogh, A.K., Christensen, K. (2013). A frameshift mutation in the LYST gene is responsible for the Aleutian color and the associated Chédiak–Higashi syndrome in American mink. *Animal Genetics*, 44(2), 178-183. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2012.02391.x>
- Anistoroaei, R., Menzorov, A., Serov, O., Farid, A., Christensen, K. (2007). The first linkage map of the American mink (*Mustela vison*). *Animal Genetics*, 38(4), 384-388. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2007.01621.x>
- Arsenic, R., Treue, D., Lehmann, A., Hummel, M., Dietel, M., Denkert, C., Budczies, J. (2015). Comparison of targeted next-generation sequencing and Sanger sequencing for the detection of PIK3CA mutations in breast cancer. *BMC Clinical Pathology*, 15, 1-9. <https://doi.org/10.1186/s12907-015-0020-6>
- Baudhuin, L. M., Lagerstedt, S. A., Klee, E. W., Fadra, N., Oglesbee, D., Ferber, M. J. (2015). Confirming variants in next-generation sequencing panel testing by Sanger sequencing. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 17(4), 456-461. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2015.03.004>
- Beck, T.F., Mullikin, J.C., (2016). Systematic Evaluation of Sanger Validation of Next-Generation Sequencing Variants. *Clinical Chemistry*, 62(4), 647–654, <https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.249623>
- Bidokhti, M. R., Ullman, K., Hammer, A. S., Jensen, T. H., Chriél, M., Byrareddy, S. N., Baule, C. (2019). Immunogenicity and efficacy evaluation of subunit astrovirus vaccines. *Vaccines*, 7(3), 79. <https://doi.org/10.3390/vaccines7030079>
- Blomström, A. L., Widén, F., Hammer, A. S., Belák, S., Berg, M. (2010). Detection of a novel astrovirus in brain tissue of mink suffering from shaking mink syndrome by use of viral metagenomics. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(12), 4392-4396. <https://doi.org/10.1128/jcm.01040-10>
- Bloom M.E., Best S.M., Hayes S.F., Wells R.D., Wolfinbarger J.B., McKenna R., Agbandje-McKenna M. (2001) Identification of Aleutian mink disease parvovirus capsid

- sequences mediating antibody-dependent enhancement of infection, virus neutralization, and immune complex formation. *Journal of Virology*, 75(22), 11116-11127. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.22.11116-11127.2001>
- Bloom, M.E., Kanno, H., Mori, S., Wolfinger, J.B. (1994). Aleutian mink disease: puzzles and paradigms. *Infectious Agents and Disease*, 3(6), 279-301.
- Botti, V., McNicoll, F., Steiner, M.C., Richter, F.M., Solovyeva, A., Wegener, M., Schwich, O. D., Poser, I., Zarnack, K., Wittig, I., Neugebauer, K. M., Müller-McNicoll, M. (2017). Cellular differentiation state modulates the mRNA export activity of SR proteins. *Journal of Cell Biology*, 216(7), 1993-2009. <https://doi.org/10.1083/jcb.201610051>
- Breig, O., Baklouti, F. (2013). Proteasome-mediated proteolysis of SRSF5 splicing factor intriguingly co-occurs with SRSF5 mRNA upregulation during late erythroid differentiation. *PLOS ONE*, 8:e59137. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059137>
- Browne, T.N., Freeman, M. (2024). Next generation sequencing: Forensic applications and policy considerations. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Forensic Science*, e1531. <https://doi.org/10.1002/wfs2.1531>
- Caballero, S., Guix, S., Ribes, E., Bosch, A., Pintó, R. M. (2004). Structural requirements of astrovirus virus-like particles assembled in insect cells. *Journal of Virology*, 78(23), 13285-13292. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.23.13285-13292.2004>
- Cai, Z., Petersen, B., Sahana, G., Madsen, L. B., Larsen, K., Thomsen, B., Bendixen, C., Lund, M.S., Guldbandsen, B., Panitz, F. (2017). The first draft reference genome of the American mink (*Neovison vison*). *Scientific Reports*, 7(1), 14564. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15169-z>
- Canuti, M., McDonald, E., Graham, S. M., Rodrigues, B., Bouchard, É., Neville, R., Pitcher, M., Whitney, H.G., Marshall, H.D., Lang, A. S. (2020). Multi-host dispersal of known and novel carnivore amdoparvoviruses. *Virus Evolution*, 6(2), veaa072. <https://doi.org/10.1093/ve/veaa072>
- Canuti, M., O’Leary, K. E., Hunter, B. D., Spearman, G., Ojkic, D., Whitney, H. G., Lang, A. S. (2016). Driving forces behind the evolution of the Aleutian mink disease parvovirus in the context of intensive farming. *Virus Evolution*, 2(1), vew004. <https://doi.org/10.1093/ve/vew004>
- Caputi, M., Freund, M., Kammler, S., Asang, C., Schaal, H. (2004). A bidirectional SF2/ASF- and SRp40-dependent splicing enhancer regulates human immunodeficiency virus type 1 rev, env, vpu, and nef gene expression. *Journal of Virology*, 78(12), 6517-6526. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.12.6517-6526.2004>

- Chen, A.B., Li, H., Wan, Y. (2024). 917 Targeting the TGF- β -SKI axis mitigates tumor immune exclusion. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 12, <https://doi.org/10.1136/jitc-2024-SITC2024.0917>
- Chen, W., Aasted, B. (1998). Analyses of leucocytes in blood and lymphoid tissues from mink infected with Aleutian mink disease parvovirus (AMDV). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 63(4), 317-334. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(98\)00110-X](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(98)00110-X)
- Chen, Y., Yang, M., Meng, F., Zhang, Y., Wang, M., Guo, X., Yang J, Zhang, H., Zhang, H., Sun, J., Wang, W. (2022). SRSF3 promotes angiogenesis in colorectal cancer by splicing SRF. *Frontiers in Oncology*, 12, 810610. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.810610>
- Christensen, L. S., Gram-Hansen, L., Chriél, M., Jensen, T. H. (2011). Diversity and stability of Aleutian mink disease virus during bottleneck transitions resulting from eradication in domestic mink in Denmark. *Veterinary microbiology*, 149(1-2), 64-71. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.10.016>
- Cohen, P. (2000). The regulation of protein function by multisite phosphorylation—a 25 year update. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(12), 596-601. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01712-6](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01712-6)
- Cohen, P. (2002). The origins of protein phosphorylation. *Nature Cell Biology*, 4(5), E127–E130. <https://doi.org/10.1038/ncb0502-e127>
- Commins, S.P., Borish, L., Steinke, J.W. (2010). Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S53-S72. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.008>
- Costello, F., Steenfos, H., Jensen, K. T., Christensen, J., Gottschalck, E., Holm, A., Aasted, B. (1999). Epitope mapping of Aleutian mink disease parvovirus virion protein VP1 and 2. *Scandinavian Journal of Immunology*, 49(4), 347-354. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.1999.00499.x>
- Cotmore, S. F., Agbandje-McKenna, M., Chiorini, J. A., Mukha, D. V., Pintel, D. J., Qiu, J., Soderlund-Venermo, M., Tattersall, P., Tijssen, P., Gatherer, D., Davison, A. J. (2014). The family parvoviridae. *Archives of Virology*, 159, 1239-1247. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1914-1>
- Cotmore, S. F., Tattersall, P. (2014). Parvoviruses: small does not mean simple. *Annual Review of Virology*, 1(1), 517-537. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-031413-085444>
- Davey, J. W., Hohenlohe, P. A., Etter, P. D., Boone, J. Q., Catchen, J. M., Blaxter, M. L. (2011). Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics*, 12(7), 499-510. <https://doi.org/10.1038/nrg3012>

- Davies, K. J. (2000). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*, 50(4-5), 279-289. <https://doi.org/10.1080/713803728>
- De Benedictis, P., Schultz-Cherry, S., Burnham, A., Cattoli, G. (2011). Astrovirus infections in humans and animals - Molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions. *Infection, Genetic and Evolution*, 11 (7): 1529-1544, <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.07.024>
- Do, D.N., Miar, Y. (2019). Evaluation of Growth Curve Models for Body Weight in American Mink. *Animals*, 10(1), 22. <https://doi.org/10.3390/ani10010022>.
- Du, X., Guo, Z., Fan, W., Hai, T., Gao, F., Li, P., Qin, Y., Chen, C., Han, Z., Ren, J., Jiao, P., Liu, W., Bi, Y., Yu, D., Wu, S. (2021). Establishment of a humanized swine model for COVID-19. *Cell Discovery*, 7(1), 70. <https://doi.org/10.1038/s41421-021-00313-x>
- Englund, L., Chriel, M., Dietz, H.H., Hedlund, K.O. (2002). Astrovirus epidemiologically linked to pre-weaning diarrhoea in mink. *Veterinary Microbiology*, 85 (1): 1-11. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(01\)00472-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(01)00472-2)
- Ensembl. (2024a). SRSF5 Gene Summary. Dostępne pod adresem https://www.ensembl.org/Neovison_vison/Gene/Summary?db=core;g=ENSNVIG0000010055 [przełgany 28.11.2024]
- Ensembl. (2024b). SRSF5 Transcript Protein Summary. Dostępne pod adresem https://www.ensembl.org/Neovison_vison/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSNVIG00000010055 [przełgany 28.11.2024]
- Farid, A.H. (2013). Aleutian mink disease virus in furbearing mammals in Nova Scotia, Canada. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 55, 1-9. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-55-10>
- Farid, A.H., Hussain, I. (2019). A comparison between intraperitoneal injection and intranasal and oral inoculation of mink with Aleutian mink disease virus. *Research in Veterinary Science*, 124, 85-92. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.02.006>
- Farid, A.H., Hussain, I. (2020). Dose response of black American mink to Aleutian mink disease virus. *Immunity, Inflammation and Disease*, 8(2), 150-164. <https://doi.org/10.1002/iid3.290>
- Farid, A.H., Hussain, I., Arju, I. (2015). Detection of Aleutian mink disease virus DNA and antiviral antibodies in American mink (*Neovison vison*) 10 days postinoculation. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 27(3), 287-294. <https://doi.org/10.1177/1040638715580982>
- Farid, A.H., Hussain, I., Rupasinghe, P.P., Stephen, J., Arju, I. (2022). Long-term antibody

- production and viremia in American mink (*Neovison vison*) challenged with Aleutian mink disease virus. *BMC Veterinary Research*, 18(1), 364. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03462-7>
- Farid, A.H., Zillig, M.L., Finley, G.G., Smith, G.C. (2012). Prevalence of the Aleutian mink disease virus infection in Nova Scotia, Canada. *Preventive Veterinary Medicine*, 106(3-4), 332-338. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.03.010>
- Fenollar, F., Mediannikov, O., Maurin, M., Devaux, C., Colson, P., Levasseur, A., Fournier, P.-E., Raoult, D. (2021). Mink, SARS-CoV-2, and the human-animal interface. *Frontiers in Microbiology*, 12, 663815. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.663815>
- Gavier-Widen, D., Brojer, C., Dietz, H.H., Englund, L., Hammer, A.S., Hedlund, K.O., Hård af Segerstad, C., Nilsson, K., Nowotny, N., Puurula, V., Thorén, P., Uhlhorn, H., Weissenböck, H., Agren, E., Klingeborn, B. (2004). Investigations into shaking mink syndrome: an encephalomyelitis of unknown cause in farmed mink (*Mustela vison*) kits in Scandinavia. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 16 (4): 305-312. <https://doi.org/10.1177/104063870401600408>
- Gąsiorek, B. (2023) Podstawy immunologicznego postępowania u nerek zakażonych wirusem choroby aleuckiej (AMDV) w celu zminimalizowania strat hodowlanych. Doctoral dissertation. Wydział Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie
- Genome Data Viewer (2024a). Dostępne pod adresem: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gdv/browser/genome/?id=GCF_020171115.1
- Gieryńska, M., Kalinowska-Gacek, E. (2009). Błony śluzowe-stan gotowości immunologicznej. Część I. *Życie Weterynaryjne*, 84(01), 115-122
- Gliński, Z., Kostro, K. (2002). Podstawy hodowli lisów i nerek. Profilaktyka i zwalczanie chorób. PWRiL, Warszawa, 189-190.
- Gliński, Z., Kostro, K. (2012). Astrowiroza nerek-observacje wstępne. *Życie Weterynaryjne*, 87(11): 922-924.
- Gliński, Z., Żmuda A. (2019). Astrowirusy. *Życie Weterynaryjne*, 94(04).
- Gollakner, R., Capua, I. (2020). Is COVID-19 the first pandemic that evolves into a panzootic?. *Veterinaria Italiana*, 56(1), 11-12. <https://doi.org/10.12834/VetIt.2246.12523.1>
- Goodwin, S., McPherson, J. D., McCombie, W. R. (2016). Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17(6), 333-351. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>
- Hameister, H., Klett, C., Bruch, J., Dixkens, C., Vogel, W., Christensen, K. (1997). Zoo-FISH

- analysis: the American mink (*Mustela vison*) closely resembles the cat karyotype. *Chromosome Research*, 5(1), 5-11. <https://doi.org/10.1023/A:1018433200553>
- Hammer, A.S., Ullman, K., Jensen, T.H., Hedlund, K. O., Czifra, G., Dietz, H.H., Baule, C. (2012). Preliminary results of field and experimental investigations of pre-weaning diarrhea in mink. *In Proceedings of the Xth International Scientific Congress in fur animal production*, 146-152. Wageningen Academic. https://doi.org/10.3920/9789086867608_022
- Han, S., Nho, K., Lee, Y. (2020). Alternative splicing regulation of an Alzheimer's risk variant in CLU. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 7079. <https://doi.org/10.3390/ijms21197079>
- Hansen, L. G., Larsen, L. E., Rasmussen, T. B., Miar, Y., Lassunière, R., Jørgensen, C. S., Ryt-Hansen, P. (2023). Investigation of the SARS-CoV-2 post-vaccination antibody response in Canadian farmed mink. *Vaccine*, 41(49), 7387-7394. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2023.10.073>
- Heather, J. M., Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>
- Holbrook, J. A., Neu-Yilik, G., Hentze, M. W., Kulozik, A. E. (2004). Nonsense-mediated decay approaches the clinic. *Nature Genetics*, 36(8), 801–808. <https://doi.org/10.1038/ng1403>
- Horecka, B. (2015) Zróżnicowanie genetyczne norki amerykańskiej (*Neovison vison*) hodowlanej i dziko żyjącej. Doctoral dissertation. Wydział Biologii i Biotechnologii Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
- Horecka, B. (2019). Genetic diversity of ranch and feral American mink (*Neovison vison* Schreber, 1777) in Poland in relation to the natural population of the species. *Belgian Journal of Zoology*, 149. <https://doi.org/10.26496/bjz.2019.30>
- Hu, G., Do, D. N., Gray, J., Miar, Y. (2020). Selection for Favorable Health Traits: A Potential Approach to Cope with Diseases in Farm Animals. *Animals* 10 (9): 1717. <https://doi.org/10.3390/ani10091717>.
- Hu, G., Do, D.N., Manafiazar, G., Kelvin, A.A., Sargolzaei, M., Plastow, G., Wang, Z., Miar, Y. (2023). Population genomics of American mink using genotype data. *Frontiers in Genetics*, 9(14), 1175408. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1175408>.
- Huang, Q., Luo, Y., Cheng, F., Best, S. M., Bloom, M. E., Qiu, J. (2014). Molecular characterization of the small nonstructural proteins of parvovirus Aleutian mink disease virus (AMDV) during infection. *Virology*, 452, 23-31. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.01.005>

- Huang, X., Madan, A. (1999). CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research*, 9(9), 868-877. <https://doi.org/10.1101/gr.9.9.868>
- Humphrey, D.G., Spencer, N. (1959). Chromosome number in the mink. *Journal of Heredity*, 50(5), 245–247. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a106918>
- Huntoon, K.M., Wang, Y., Eppolito, C.A., Barbour, K.W., Berger, F.G., Shrikant, P.A., Baumann, H. (2008). The acute phase protein haptoglobin regulates host immunity. *Journal of Leucocyte Biology*, 84(1), 170-181. <https://doi.org/10.1189/jlb.0208100>
- Hussain, I., Price, G.W., Farid, A.H. (2014) Inactivation of Aleutian mink disease virus through high temperature exposure in vitro and under field-based composting conditions. *Veterinary Microbiology*, 173, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.07.014>.
- Jakubczak, A., Kowalczyk, M., Kostro, K., Horecka, B., Jezewska-Witkowska, G. (2016). High molecular polymorphism of the hypervariable region in the VP2 gene of Aleutian mink disease virus. *Acta Virologica*, 60, 354-360. https://doi.org/10.4149/av_2016_04_354
- Jakubczak, A., Kowalczyk, M., Mazurkiewicz, I., Kondracki, M. (2021). Detection of mink astrovirus in Poland and further phylogenetic comparison with other European and Canadian astroviruses. *Virus Genes*, 57(3), 258-265. <https://doi.org/10.1007/s11262-021-01834-z>
- Jakubisiak, M., Lasek W., Sokłosa T., Gołąb J. Immunologia. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2020.
- Jensen, P.V., Castelruiz, Y., Aasted, B. (2003). Cytokine profiles in adult mink infected with Aleutian mink disease parvovirus. *Journal of Virology*, 77(13), 7444-7451. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.13.7444-7451.2003>
- Jensen, T.H., Chriél, M., Hansen, M.S. (2015). Progression of experimental chronic Aleutian mink disease virus infection. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 58, 1-10. <https://doi.org/10.1186/s13028-016-0214-7>
- Jensen, T.H., Chriél, M., Hansen, M.S. (2015). Progression of experimental chronic Aleutian mink disease virus infection. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 58, 1-10. <https://doi.org/10.1186/s13028-016-0214-7>
- Jensen, T.H., Hammer, A. S., Chriél, M. (2014). Monitoring chronic infection with a field strain of Aleutian mink disease virus. *Veterinary Microbiology*, 168(2-4), 420-427. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.11.041>
- Jepsen, J.R., d'Amore, F., Baandrup, U., Clausen, M.R., Gottschalck, E., Aasted, B. (2009). Aleutian mink disease virus and humans. *Emerging Infectious Diseases*, 15(12), 2040-2042. <https://doi.org/10.3201/eid1512.090514>

- John, J.L. (1994). The avian spleen: a neglected organ. *Quarterly Review of Biology*, 69, 327-351 <https://doi.org/10.1086/418649>
- Kadowaki, T., Kadowaki, H., Accili, D., Taylor, S. I. (1990). Substitution of lysine for asparagine at position 15 in the alpha-subunit of the human insulin receptor. A mutation that impairs transport of receptors to the cell surface and decreases the affinity of insulin binding. *Journal of Biological Chemistry*, 265(31), 19143-19150. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)30636-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)30636-1)
- Karimi, K., Do, D.N., Sargolzaei, M., Miar, Y. (2021b). Population genomics of American mink using whole genome sequencing data. *Genes*, 12(2), 258. <https://doi.org/10.3390/genes12020258>
- Karimi, K., Do, D.N., Wang, J., Easley, J., Borzouie, S., Sargolzaei, M., Plastow, G., Wang, Z., Miar, Y. (2022). A chromosome-level genome assembly reveals genomic characteristics of the American mink (*Neogale vison*). *Communications Biology*, 5(1), 1381. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-04341-5>
- Karimi, K., Farid, A. H., Sargolzaei, M., Myles, S., Miar, Y. (2020). Linkage disequilibrium, effective population size and genomic inbreeding rates in American mink using genotyping-by-sequencing data. *Frontiers in Genetics*, 11, 223. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00223>
- Karimi, K., Farid, A.H., Myles, S., Miar, Y. (2021a). Detection of selection signatures for response to Aleutian mink disease virus infection in American mink. *Scientific Reports*, 11, 2944. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82522-8>
- Karimi, K., Sargolzaei, M., Plastow, G. S., Wang, Z., Miar, Y. (2018). Genetic and phenotypic parameters for litter size, survival rate, gestation length, and litter weight traits in American mink. *Journal of Animal Science*, 96(7), 2596-2606. <https://doi.org/10.1093/jas/sky178>.
- Karimi, K., Sargolzaei, M., Plastow, G. S., Wang, Z., Miar, Y. (2019). Opportunities for genomic selection in American mink: A simulation study. *PLoS One*, 14(3), e0213873. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213873>.
- Kelly, C. E., Thymiakou, E., Dixon, J. E., Tanaka, S., Godwin, J., Episkopou, V. (2013). Rnf165/Ark2C enhances BMP-Smad signaling to mediate motor axon extension. *PLoS biology*, 11(4), e1001538. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001538>
- Khajavi, M., Inoue, K., Lupski, J.R. (2006). Nonsense-mediated mRNA decay modulates clinical outcome of genetic disease. *European Journal of Human Genetics*, 14(11), 1074–1081. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201649>

- Knol, E. F., Nielsen, B., Knap, P. W. (2016). Genomic selection in commercial pig breeding. *Animal Frontiers*, 6(1), 15-22. <https://doi.org/10.2527/af.2016-0003>
- Kondracki, M., Jakubczak, A., Kowalczyk, M., Mazurkiewicz, I., Moryl, M., Kaczmarczyk, J. (2023). Genetic differences in variants of the AMD virus at the site of a disease outbreak. *Virology*, 587, 109851. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2023.109851>
- Kopczewski, A., Kalicki, M., Miśków, M., Dominiak-Górski, B. (2009) Nosówka mięsożernych zwierząt futerkowych i nieudomowionych. *Medycyna Weterynaryjna*, 65(9), 588-592.
- Kostro, K., Wojcicka-Lorenowicz, K., Siemionek, J. (1999). Choroba aleucka nerek. *Medycyna Weterynaryjna*, 55(7), 423-429.
- Kowalczyk, M., Horecka, B., Jakubczak, A. (2019). Aleutian mink disease virus in the breeding environment in Poland and its place in the global epidemiology of AMDV. *Virus Research*, 270, 197665. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197665>
- Kowalczyk, M., Jakubczak, A. (2015). Możliwość wykorzystania technik biologii molekularnej w diagnostyce choroby aleuckiej nerek. *Wiadomości Zootechniczne*, 53(3).
- Kowalczyk, M., Jakubczak, A. (2016). Choroby astrowirusowe nerek – przyczyna, objawy, diagnostyka. *Wiadomości Zootechniczne*, 54(3).
- Kowalczyk, M., Jakubczak, A., Horecka, B., Kostro, K. (2018). A comparative molecular characterization of AMDV strains isolated from cases of clinical and subclinical infection. *Virus Genes*, 54, 561-569. <https://doi.org/10.1007/s11262-018-1576-x>
- Kowalska, D., Gugolek, A. (2017). Norka na tle przedstawicieli rodziny łasicowatych występujących w Polsce. *Wiadomości Zootechniczne*, R. LV, (3), 35–41
- Kwinta, Ł. (2008). The role of non-coding sequences in melanoma carcinogenesis. *Contemporary Oncology/Współczesna Onkologia*, 12(3), 99-106.
- Kyte, J., Doolittle, R.F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157(1), 105-132. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90515-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0)
- Lambeth, J.D., Kawahara, T., Diebold, B. (2007). Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(3), 319-331. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.028>
- Lande, O. (1957). The chromosomes of the mink. *Hereditas*, 43, 578-582. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1957.tb03460.x>
- Larsen, S., Alexandersen, S., Lund, E., Have, P., Hansen, M. (1984). Acute interstitial pneumonitis caused by Aleutian disease virus in mink kits. *Acta Pathologica*

- Microbiologica Scandinavica Series A: Pathology*, 92(1-6), 391-393.
<https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1984.tb04419.x>
- Lecis, R., Ferrando, A., Ruiz-Olmo, J., Mañas, S., Domingo-Roura, X. (2008). Population genetic structure and distribution of introduced American mink (*Mustela vison*) in Spain, based on microsatellite variation. *Conservation Genetics*, 9, 1149-1161.
<https://doi.org/10.1007/s10592-007-9428-6>
- Li, J., Li, G., Qi, Y., Lu, Y., Wang, H., Shi, K., Li, D., Shi, J., Stovall, D. B., Sui, G. (2021). SRSF5 regulates alternative splicing of DMTF1 pre-mRNA through modulating SF1 binding. *RNA biology*, 18 (sup1), 318–336.
<https://doi.org/10.1080/15476286.2021.1947644>
- Liang, J., Wang, T., Wang, Q., Wang, X., Fan, X., Hu, T., Leng, X., Shi, K., Li, J., Gong, Q., Du, R. (2024). Prevalence of canine distemper in minks, foxes and raccoon dogs from 1983 to 2023 in Asia, North America, South America and Europe. *Frontiers in Veterinary Science*, 11, 1394631. <https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1394631>
- Liu, J.L., Wang, T. S., Zhao, M. (2016). Genome-wide association mapping for female infertility in inbred mice. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 6(9), 2929-2935.
<https://doi.org/10.1534/g3.116.031575>
- Liu, L., Dilworth, D., Gao, L., Monzon, J., Summers, A., Lassam, N., Hogg, D. (1999). Mutation of the CDKN2A 5'UTR creates an aberrant initiation codon and predisposes to melanoma. *Nature genetics*, 21(1), 128-132. <https://doi.org/10.1038/5082>
- Lu, T., Zhang, H., Zhou, J., Ma, Q., Yan, W., Zhao, L., Wu, S., Chen, H. (2021) Aptamer-targeting of Aleutian mink disease virus (AMDV) can be an effective strategy to inhibit virus replication. *Scientific Reports*, 11(1), 4649. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84223-8>
- Ma, F., Zhang, L., Wang, Y., Lu, R., Hu, B., Lv, S., Xue, X., Li, X., Ling, M., Fan, S., Zhang, H., Yan, X. (2016). Development of a peptide ELISA for the diagnosis of aleutian mink disease. *PLoS One*, 11(11), e0165793. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165793>
- Macias, M.J., Martin-Malpartida, P., Massagué, J. (2015). Structural determinants of Smad function in TGF- β signaling. *Trends in Biochemical Sciences*, 40(6), 296-308.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.03.012>
- Mamanova, L., Coffey, A.J., Scott, C. E., Kozarewa, I., Turner, E.H., Kumar, A., Howard, E., Shendure, J., Turner, D.J. (2010). Target-enrichment strategies for next-generation sequencing. *Nature Methods*, 7(2), 111-118. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1419>
- Markarian, N.M., Abrahamyan, L. (2021). AMDV vaccine: challenges and perspectives.

Viruses, 13(9), 1833. <https://doi.org/10.3390/v13091833>

- Martino, D., Maksimovic, J., Joo, J.H., Prescott, S.L., Saffery, R. (2012). Genome-scale profiling reveals a subset of genes regulated by DNA methylation that program somatic T-cell phenotypes in humans. *Genes & Immunity*, 13(5), 388-398. <https://doi.org/10.1038/gene.2012.7>.
- Master, A., Nauman, A. (2014). Molekularne mechanizmy inicjacji biosyntezy białek–biochemiczne i biomedyczne implikacje nowego modelu translacji wzmacnianej przez element RNA odpowiedzi na hipoksję (rHRE). Molecular mechanisms of protein biosynthesis initiation–biochemical and biomedical implications of a new model of translation enhanced by the RNA hypoxia response element (rHRE)). *Postępy Biochemii*, 60, 39-54.
- Mendez, E., Aguirre-Crespo, G., Zavala, G., Arias, C.F. (2007). Association of the astrovirus structural protein VP90 with membranes plays a role in virus morphogenesis. *Journal of Virology*, 81, 10649-10658. <https://doi.org/10.1128/jvi.00785-07>.
- Metzker, M.L. (2010). Sequencing technologies—the next generation. *Nature reviews genetics*, 11(1), 31-46. <https://doi.org/10.1038/nrg2626>
- MGI, 2024a Dostępne pod adresem: <https://www.informatics.jax.org/marker/MGI:3645984> [przełądany 27.10.2024]
- Michalska-Parda, A., Brzeziński, M., Zalewski, A., Kozakiewicz, M. (2009). Genetic variability of feral and ranch American mink *Neovison vison* in Poland. *Mammal Research*, 54(1), 1-10. <https://doi.org/10.1007/BF03193132>
- Mittelholzer, C., Hedlund, K.O., Englund, L., Dietz, H.H., Svensson, L. (2003). Molecular characterization of a novel astrovirus associated with disease in mink. *Journal of General Virology*, 84(11), 3087-3094. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19267-0>
- Mora, M., Medina-Vogel, G., Sepúlveda, M.A., Noll, D., Álvarez-Varas, R., Vianna, J.A. (2018). Genetic structure of introduced American mink (*Neovison vison*) in Patagonia: colonisation insights and implications for control and management strategies. *Wildlife Research*, 45(4), 344-356. <https://doi.org/10.1071/wr18026>
- Mori, S., Nose, M., Miyazawa, M., Kyogoku, M., Wolfenbarger, J.B., Bloom, M.E. (1994). Interstitial nephritis in Aleutian mink disease. Possible role of cell-mediated immunity against virus-infected tubular epithelial cells. *The American Journal of Pathology*, 144(6), 1326.
- Nituch, L.A., Bowman, J., Beauclerc, K.B., Schulte-Hostedde, A. I. (2011). Mink farms predict

- Aleutian disease exposure in wild American mink. *PLoS One*, 6(7), e21693. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021693>
- Olofsson, A., Mittelholzer, C., Treiberg Berndtsson, L., Lind, L., Mejerland, T., Belák, S. (1999). Unusual, high genetic diversity of Aleutian mink disease virus. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(12), 4145-4149. <https://doi.org/10.1128/jcm.37.12.4145-4149.1999>
- Oreshkova, N., Molenaar, R.J., Vreman, S., Harders, F., Munnink, B.B.O., Hakze-van Der Honing, R.W., Gerhards, N., Tolsma, P., Bouwstra, R., Sikkema, R.S., Tacken, M.G.J., de Rooij, M.M.T., Weesendorp, E., Engelsma, M.Y., Brusckhe, C.J.M., Smit, L.A.M., Koopmans, M., van der Poel, W.H.M., Stegeman, A. (2020). SARS-CoV-2 infection in farmed minks, the Netherlands, April and May 2020. *Eurosurveillance*, 25(23), 2001005. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.23.2001005>
- Panicz, R., Eljasik, P., Skorupski, J., Śmietana, P., Stefánsson, R. A., von Schmalensee, M., Szenejko, M. (2021). Assessment of Aleutian mink disease virus (AMDV) prevalence in feral American mink in Iceland. Case study of a pending epizootiological concern in Europe. *PeerJ*, 9, e12060. <https://doi.org/10.7717/peerj.12060>
- Pareek, C.S., Smoczynski, R., Tretyn, A. (2011). Sequencing technologies and genome sequencing. *Journal of Applied Genetics*, 52(4), 413-435. <https://doi.org/10.1007/s13353-011-0057-x>
- Parkin, J., Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *The Lancet*, 357(9270), 1777-1789. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04904-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04904-7).
- Patterson, B.D., Ramírez-Chaves, H.E., Vilela, J.F., Soares, A.E.R., Grewe, F. (2021). On the nomenclature of the American clade of weasels (Carnivora: Mustelidae). *Journal of Animal Diversity*, 3(2), 1-8. <https://doi.org/10.52547/JAD.2021.3.2.1>
- Patterson, E.I., Elia, G., Grassi, A., Giordano, A., Desario, C., Medardo, M., Smith, S.L., Anderson, E.R., Prince, T., Patterson, G.T., Lorusso, E., Lucente, M.S., Lanave, G., Lauzi, S., Bonfanti, U., Stranieri, A., Martella, V., Solari Basano, F., Barrs, V.R., Radford, A.D., Agrimi, U., Hughes, G.L., Paltrinieri, S., Decaro, N. (2020). Evidence of exposure to SARS-CoV-2 in cats and dogs from households in Italy. *Nature communications*, 11(1), 6231. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20097-0>
- Persson, S., Jensen, T.H., Blomström, A.L., Appelberg, M.T., Magnusson, U. (2015). Aleutian mink disease virus in free-ranging mink from Sweden. *PloS One*, 10(3), e0122194. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122194>
- Piórkowska, M., Kowalska, D. (2014). Charakterystyka populacji hodowlanych i dziko

- żyjących norek amerykańskich. *Wiadomości Zootechniczne*, 52(2), 122-129.
- Porter D.D., Larsen A.E., Porter H.G. (1969). The pathogenesis of Aleutian disease of mink: I. In vivo viral replication and the host antibody response to viral antigen. *The Journal of Experimental Medicine*, 130(3), 575-593. <https://doi.org/10.1084/jem.130.3.575>
- Porter, D.D., Larsen, A.E., Porter, H.G. (1973). The pathogenesis of aleutian disease of mink: III. Immune complex arteritis. *The American Journal of Pathology*, 71(2), 331.
- Powers, S.K., Jackson, M.J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological Reviews*, 88(4), 1243-1276. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2007>
- Prieto, A., Díaz-Cao, J. M., Fernández-Antonio, R., Panadero, R., Díaz, P., López, C., Morrondo, P., Díez-Baños, P., Fernández, G. (2014). Application of real-time PCR to detect Aleutian Mink Disease Virus on environmental farm sources. *Veterinary Microbiology*, 173(3-4), 355-359. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.07.024>
- Prieto, A., Fernández-Antonio, R., Díaz-Cao, J.M., López, G., Díaz, P., Alonso, J.M., Morrondo, P., Fernández, G. (2017). Distribution of Aleutian mink disease virus contamination in the environment of infected mink farms. *Veterinary Microbiology*, 204, 59-63. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.04.013>
- Prieto, A., Fernández-Antonio, R., López-Lorenzo, G., Díaz-Cao, J.M., López-Novo, C., Remesar, S., Panadero, R., Díaz, P., Morrondo, P., Díez-Baños, P., Fernández, G. (2020). Molecular epidemiology of Aleutian mink disease virus causing outbreaks in mink farms from Southwestern Europe: A retrospective study from 2012 to 2019. *Journal of Veterinary Science*, 21(4). <https://doi.org/10.4142/jvs.2020.21.e65>
- Przywara, K., Siemionek, J., Jakubowski, T., Konczyk-Kmiecik, K., Szczerba-Turek, A. (2024). Prevalence of Aleutian Mink Disease Virus (AMDV) in Free-Ranging American Mink from Biebrza and Narew National Parks (Poland)—An Epidemiological Concern. *Animals*, 14(17), 2584. <https://doi.org/10.3390/ani14172584>
- Ratnadiwakara, M., Archer, S.K., Dent, C. I., De Los Mozos, I. R., Beilharz, T.H., Knaupp, A.S., Nefzger, C.M., Polo, J.M., Anko, M.L. (2018). SRSF3 promotes pluripotency through Nanog mRNA export and coordination of the pluripotency gene expression program. *eLife*, 7, e37419. <https://doi.org/10.7554/eLife.37419>
- Reichert, M., Kostro, K. (2014a). Effect of persistent infection of mink with Aleutian mink disease virus on reproductive failure. *Journal of Veterinary Research*, 58(3), 369-373. <https://doi.org/10.2478/bvip-2014-0057>
- Reichert, M., Kostro, K. (2014b). NS1 gene based molecular characteristics of Aleutian mink

- disease virus circulating in Poland. *Journal of Veterinary Research*, 58(2), 187-191.
<https://doi.org/10.2478/bvip-2014-0028>
- Rifai, A. (1987). Experimental models for IgA-associated nephritis. *Kidney International*, 31(1), 1-7. <https://doi.org/10.1038/ki.1987.1>
- Ross, M.G., Russ, C., Costello, M., Hollinger, A., Lennon, N.J., Hegarty, R., Nusbaum, C., Jaffe, D.B. (2013). Characterizing and measuring bias in sequence data. *Genome Biology*, 14, 1-20. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-5-r51>
- Ryt-Hansen, P., Hjulsager, C.K., Hagberg, E.E., Chriél, M., Struve, T., Pedersen, A.G., Larsen, L.E. (2017). Outbreak tracking of Aleutian mink disease virus (AMDV) using partial NS1 gene sequencing. *Virology Journal*, 14, 1-9. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0786-5>
- Sailleau, C., Dumarest, M., Vanhomwegen, J., Delaplace, M., Caro, V., Kwasiborski, A., Hourdel, V., Chevaillier, P., Barbarino, A., Comtet, L., Pourquier, P., Klonjkowski, B., Manuguerra, J.-C., Zientara, S., Le Poder, S. (2020). First detection and genome sequencing of SARS - CoV - 2 in an infected cat in France. *Transboundary and emerging diseases*, 67(6), 2324-2328. <https://doi.org/10.1111/tbed.13659>
- Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current biology*, 24(10), R453-R462. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
- Schlottau, K., Rissmann, M., Graaf, A., Schön, J., Sehl, J., Wylezich, C., Höper, D., Mettenleiter, T.C., Balkema-Buschmann, A., Harder, T., Grund, C., Hoffmann, D., Breithaupt, A., Beer, M. (2020). Experimental transmission studies of SARS-CoV-2 in fruit bats, ferrets, pigs and chickens. *The Lancet Microbe*, 1(5), e218-e225. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(20\)30089-6](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30089-6)
- Schulte-Hostedde, A.I., Bowman, J., Nituch, L.A. (2012). Dynamic spleen mass in wild and domestic American mink. *Biological Journal of the Linnean Society*, 107, 624-631 <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2012.01961.x>
- Schwarz, J.M., Rödelsperger, C., Schuelke, M., Seelow, D. (2010). MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nature Methods*, 7(8), 575-576. <https://doi.org/10.1038/nmeth0810-575>
- Serov, O.L. (1998). The American mink gene map, *ILAR Journal*, 39(2-3), 189-194, <https://doi.org/10.1093/ilar.39.2-3.189>
- Shackelford, R.M., Wipf, L. (1947). Chromosomes of the Mink. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 33(2), 44-46. <https://doi.org/10.1073/pnas.33.2.44>

- Shi, J., Wen, Z., Zhong, G., Yang, H., Wang, C., Huang, B., Liu, R., He, X., Shuai, L., Sun, Z., Zhao, Y., Liu, P., Liang, L., Cui, P., Wang, J., Zhang, X., Guan, Y., Tan, W., Wu, G., Chen, H., Bu, Z., Bu, Z. (2020). Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS–coronavirus 2. *Science*, 368(6494), 1016-1020. <https://doi.org/10.1126/science.abb7015>
- Sit, T.H., Brackman, C.J., Ip, S.M., Tam, K.W., Law, P.Y., To, E.M., Yu, V.Y.T., Sims, L.D., Tsang, D.N.C., Chu, D.K.W., Perera, R.A.P.M., Poon, L.L.M., Peiris, M. (2020). Infection of dogs with SARS-CoV-2. *Nature*, 586(7831), 776-778. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2334-5>
- Smith, L.D., Willig, L.K., Kingsmore, S.F. (2016). Whole-exome sequencing and whole-genome sequencing in critically ill neonates suspected to have single-gene disorders. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(2), a023168. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023168>
- Souvorov, A., Kapustin, Y., Kiryutin, B., Chetvernin, V., Tatusova, T., Lipman, D. (2010). Gnomon–NCBI eukaryotic gene prediction tool. *National Center for Biotechnology Information*, 1-24. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/core/assets/genome/files/Gnomon-description.pdf>. [przełgądany 30.10. 2024]
- Suarez, D.L., Pantin-Jackwood, M.J., Swayne, D.E., Lee, S.A., DeBlois, S.M., Spackman, E. (2020). Lack of susceptibility to SARS-CoV-2 and MERS-CoV in poultry. *Emerging Infectious Diseases*, 26(12), 3074. <https://doi.org/10.3201/eid2612.202989>
- Suzuki, Y., i Tomino, Y. (2008). Potential immunopathogenic role of the mucosa–bone marrow axis in IgA nephropathy: Insights from animal models. *Seminars in nephrology* 28(1), 66-77. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2007.10.008>
- Swanson, C.M., Sherer, N.M., Malim, M.H. (2010). SRp40 and SRp55 promote the translation of unspliced human immunodeficiency virus type 1 RNA. *Journal of Virology*, 84, 6748–6759. <https://doi.org/10.1128/JVI.02526-09>.
- Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38, 3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Tao, Z., Lin, X., Liu, Y., Ji, F., Wang, S., Xiong, P., Zhang L., Xu Q., Xu A., Cui, N. (2022). Detection of multiple human astroviruses in sewage by next generation sequencing. *Water Research*, 218, 118523. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118523>
- Teraoka, S. N., Telatar, M., Becker-Catania, S., Liang, T., Onengut, S., Tolun, A., Chessa, L., Sanal, Ö., Bernatowska, E., Gatti, R. A., Concannon, P. (1999). Splicing defects in the

- ataxia-telangiectasia gene, ATM: underlying mutations and consequences. *The American Journal of Human Genetics*, 64(6), 1617-1631. <https://doi.org/10.1086/302418>
- Thirstrup, J. P., Ruiz-Gonzalez, A., Pujolar, J. M., Larsen, P. F., Jensen, J., Randi, E., Zalewski, A., Pertoldi, C. (2015). Population genetic structure in farm and feral American mink (*Neovison vison*) inferred from RAD sequencing-generated single nucleotide polymorphisms. *Journal of Animal Science*, 93(8), 3773-3782. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-8996>
- Trautwein, G., Müller-Peddinghaus, R. (1981). Aleutian disease of mink: A systemic immune complex vascular disease of viral origin. In *Arthritis: Models and Mechanisms* (pp. 96-105). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Ulrich, L., Wernike, K., Hoffmann, D., Mettenleiter, T. C., Beer, M. (2020). Experimental infection of cattle with SARS-CoV-2. *Emerging infectious diseases*, 26(12), 2979. <https://doi.org/10.3201/eid2612.203799>
- UniProt (2024a). Dostępne pod adresem: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/U6D3R2/entry> [przełdany: 28.10.2024]
- UniProt (2024b). Dostępne pod adresem: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/U6D3R2/entry> [przełdany: 04.11.2024]
- UniProt (2024c) Dostępne pod adresem: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A8C7EJ26/entry> [przełdany: 13.11.2024]
- Vahedi, S.M., Ardestani, S.S., Banabazi, M.H., Clark, F. (2023). Epidemiology, pathogenesis, and diagnosis of Aleutian disease caused by Aleutian mink disease virus: A literature review with a perspective of genomic breeding for disease control in American mink (*Neogale vison*). *Virus Research*, 336, 199208. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2023.199208>
- Valdovska, A., i Pilmane, M. (2011). Histopathologic and immunohistochemical lesions in liver of mink infected with Aleutian disease virus. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. <https://doi.org/10.2478/v10181-011-0010-2>
- Varsome. (2024a). Dostęp pod adresem: <https://varsome.com/gene/hg38/SRSF5> Data ostatniego dostępu: 20.10.2024.
- Virtanen, J., Zalewski, A., Kołodziej-Sobocińska, M., Brzeziński, M., Smura, T., Sironen, T. (2021). Diversity and transmission of Aleutian mink disease virus in feral and farmed American mink and native mustelids. *Virus Evolution*, 7(2), 1-12. <https://doi.org/10.1093/ve/veab075>

- Wagner, R. E., Frye, M. (2021). Noncanonical functions of the serine-arginine-rich splicing factor (SR) family of proteins in development and disease. *Bioessays*, 43(4), 2000242. <https://doi.org/10.1002/bies.202000242>
- Wang, F., Wang, H., Tuan, H. F., Nguyen, D. H., Sun, V., Keser, V., Bowne, S. J., Sullivan, L. S., Luo, H., Zhao, L., Wang, X., Zaneveld, J. E., Salvo, J. S., Siddiqui, S., Mao, L., Wheaton, D. K., Birch, D. G., Branham, K. E., Heckenlively, J. R., Wen, C., Flagg, K., Ferreyra, H., Pei, J., Khan, A., Ren, H., Wang, K., Lopez, I., Qamar, R., Zenteno, J. C., Ayala-Ramirez, R., Buentello-Volante, B., Fu, Q., Simpson, D. A., Li, Y., Sui, R., Silvestri, G., Daiger, S. P., Koenekoop, R. K., Zhang, K., Chen, R. (2014). Next generation sequencing-based molecular diagnosis of retinitis pigmentosa: identification of a novel genotype-phenotype correlation and clinical refinements. *Human genetics*, 133, 331-345. <https://doi.org/10.1007/s00439-013-1381-5>
- Wang, W., Bi, Z., Liu, Y., Xia, X., Qian, J., Tan, Y., Zhu, Y., Song, S., Yan, L. (2023) Development of a monoclonal antibody recognizing novel linear neutralizing epitope on H protein of panine dis temper virus vaccine strains (America-1 genotype). *International Journal of Biological Macromolecules*, 246, 125584, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125584>
- Wang, Z., Burge, C.B. (2008). Splicing regulation: From a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA*, 14(5), 802–813. <https://doi.org/10.1261/rna.876308>
- Wicherska-Pawłowska, K., Wróbel, T., Rybka, J. (2021). Toll-Like Receptors (TLRs), NOD-Like Receptors (NLRs), and RIG-I-Like Receptors (RLRs) in Innate Immunity. TLRs, NLRs, and RLRs Ligands as Immunotherapeutic Agents for Hematopoietic Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24), 13397. <https://doi.org/10.3390/ijms222413397>
- Wiggans, G. R., Cole, J. B., Hubbard, S. M., Sonstegard, T. S. (2017). Genomic selection in dairy cattle: the USDA experience. *Annual Review of Animal Biosciences*, 5(1), 309-327. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-021815-111422>.
- Wildi, N., Seuberlich, T. (2021). Neurotropic Astroviruses in Animals. *Viruses*, 13, 1201. <https://doi.org/10.3390/v13071201>
- Wilson, D.J., Baldwin, T. J., Whitehouse, C. H., Hullinger, G. (2015). Causes of mortality in farmed mink in the Intermountain West, North America. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 27(4), 470-475. <https://doi.org/10.1177/1040638715586438>

- Xi, J., Wang, J., Yu, Y., Zhang, X., Mao, Y., Hou, Q., Liu, W. (2016). Genetic characterization of the complete genome of an Aleutian mink disease virus isolated in north China. *Virus Genes*, 52, 463-473. <https://doi.org/10.1007/s11262-016-1320-3>
- Xiong, J., Chen, Y., Wang, W., Sun, J. (2022). Biological function and molecular mechanism of SRSF3 in cancer and beyond. *Oncology Letters*, 23(1), 1-11. <https://doi.org/10.3892/ol.2021.13139>
- Yang, S., Jia, R., Bian, Z. (2018). SRSF5 functions as a novel oncogenic splicing factor and is upregulated by oncogene SRSF3 in oral squamous cell carcinoma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1865(9), 1161-1172. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.05.017>
- Zaleska-Wawro, M., Szczerba-Turek, A., Szweda, W., Siemionek, J. (2021). Seroprevalence and Molecular Epidemiology of Aleutian Disease in Various Countries during 1972–2021: A Review and Meta-Analysis. *Animals*, 11(10), 2975. <https://doi.org/10.3390/ani11102975>
- Zalewski A., Zalewska H., Lunneryd S.-G., André C., Mikusiński G. (2016). Reduced genetic diversity and increased structure in American mink on the Swedish coast following invasive species control. *PLOS ONE* 11 (6), e0157972. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157972>
- Zalewski, A., Brzeziński, M. (2014). Norka amerykańska. *Biologia gatunku inwazyjnego*. Instytut Biologii Ssaków PAN, Białowieża, 5-43
- Zhang, Q., Zhang, H., Gao, J., Huang, K., Yang, Y., Hui, X., He, X., Li, C., Gong, W., Zhang, Y., Zhao, Y., Peng, C., Gao, X., Chen, H., Zou, Z., Shi, Z.-L., Jin, M. (2020). A serological survey of SARS-CoV-2 in cat in Wuhan. *Emerging microbes & infections*, 9(1), 2013-2019. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1817796>
- Zhang, Y., Wang, H. (2012). Integrin signalling and function in immune cells. *Immunology*, 135(4), 268-275. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2011.03549.x>
- Zhao J., Shi N., Sun Y., Martella V., Nikolin V., Zhu C., Zhang H., Hu B., Bai X., Yan X. (2015). Pathogenesis of panine distemper virus in experimentally infected raccoon dogs, foxes, and minks, *Antiviral Research*, 122, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.07.007>

Żmuda, A., Lisiecka, U., Dudek, K., Dąbrowski, R., Gąsiorek, B., Winiarczyk, S., Kostro, K. (2022). Phagocytic Activity, Oxygen Metabolism and Serum Amyloid a Concentration in Peripheral Blood of Mink with Subclinical Aleutian Virus Infection. *Animals*, 12(8), 987. <https://doi.org/10.3390/ani12080987>

