

Olsztyn, 14.02.2025 r.

Prof. dr hab. Andrzej Gugolek
Wydział Bioinżynierii Zwierząt
Katedra Hodowli Zwierząt
Futerkowych i Łowiectwa
UWM w Olsztynie

O c e n a

rozprawy doktorskiej mgr Ilony Mazurkiewicz pt.: „*Polimorfizm molekularny genów odporności na choroby wirusowe u norki amerykańskiej (Neovison vison)*”, wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Andrzeja Jakubczaka w Instytucie Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej, Wydziale Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki w Uniwersytecie Przyrodniczym w Lublinie.

Norka amerykańska (*Neogale vison/Neovison vison*) to najważniejszy gospodarczo i najliczniej hodowany na świecie i w Polsce gatunek zwierzęcia futerkowego. Obok zwierząt hodowanych przez człowieka, istnieją także liczne wolnożyjące populacje nerek w różnych rejonach świata. Norki hodowlane utrzymywane najczęściej w fermach wielkostadnych narażone są na różnorodne schorzenia i problemy zdrowotne, wywoływane między innymi przez wirusy. Najczęściej występującą, znaną od lat i nadal sprawiającą problemy chorobą wirusową jest choroba aleucka - Aleutian Disease (AD), wywoływana przez wirusa choroby aleuckiej nerek - Aleutian Mink Disease Virus (AMDV). Powoduje ona nadal znaczne straty ekonomiczne w hodowli, manifestując się najczęściej obniżeniem wyników rozrodu i pogorszeniem poziomu dobrostanu zwierząt. Wirus AMD bardzo łatwo rozprzestrzenia się oraz wykazuje znaczną odporność na czynniki środowiskowe, co w konsekwencji powoduje, że nie jest łatwo usunąć go z ferm. Wymusza to na hodowcach poszukiwanie metod profilaktyki, tym bardziej, że nie są znane skuteczne szczepionki przeciwko chorobie aleuckiej. Brak profilaktyki swoistej wymusza konieczność opracowania innych metod zapobiegających lub ograniczających straty hodowlane z powodu tej choroby. Obecnie metodą powszechnie stosowaną jest eliminowanie ze stada zwierząt chorych i nosicieli. Inną obiecującą możliwością jest selekcja genetyczna nerek w kierunku zwiększonej odporności na zakażenie wirusem AMD. Prowadzenie zatem badań nad genami kandydującymi do selekcji nerek tolerujących chorobę aleucką uważam za celowe i bardzo przydatne dla hodowli nerek na świecie i w Polsce zarówno w aspekcie ekonomicznym,

jak i poprawy zdrowotności zwierząt na fermach.

Przesłana do oceny rozprawa, przygotowana została w formie monografii. Obejmuje łącznie 151 stron maszynopisu, 20 tabel, 39 rycin i posiada typową konstrukcję dla tego typu prac. Rozpoczyna się krótkimi „Streszczeniem” i „Summary”. Główne rozdziały pracy to: „Wstęp”, „Cel i hipotezy badawcze”, „Materiały i metody”, „Wyniki”, „Dyskusja”, „Podsumowanie i wnioski”. Rozprawa zawiera także „Bibliografię” oraz 3 załączniki, na których przedstawiono porównania sekwencji aminokwasowej białek: Serine and Arginine Rich Splicing Factor 5 (*SRSF5*), *RING Finger Protein 165 (RNF165)* i *SKI Family Transcriptional Corepressor 2 (SKOR2)*.

Tytuł ocenianej pracy doktorskiej dobrze charakteryzuje treści w niej zawarte, podobnie jak zaproponowane przez Autorkę słowa kluczowe. W poprzedzających zasadniczą część pracy „Streszczeniu” i anglojęzycznym „Summary” przedstawiono zawartość pracy oraz opisano uzyskane wyniki. Mam jednak wrażenie, że zabrakło ich krótkiego finalnego podsumowania.

„Wstęp”, podzielono na szereg podrozdziałów dotyczących zagadnień przedstawionych w pracy. Opisano taksonomię i morfologię gatunku, układ immunologiczny norek, wybrane jednostki chorobowe występujące u norek, procesy odpornościowe na przykładzie choroby aleuckiej, reakcję układu immunologicznego na zakażenie tą chorobą, czynniki wpływające na patogenezę, diagnostykę choroby aleuckiej, charakterystykę genomu norki amerykańskiej oraz dokładną charakterystykę genów odpowiedzialnych za odporność: *SRSF5*, *RNF165*, *SKOR2*. „Wstęp” zawiera nie tylko tekst, lecz także 6 rycin ilustrujących opisywaną problematykę genetyczną. Rozdział ten został bardzo dobrze przygotowany, wyjaśnia wiele zagadnień poruszanych w dalszej części pracy i umożliwia Czytelnikom ich właściwe zrozumienie. Mam jedynie drobną uwagę do rozdziału 1.4., w którym Autorka podała długości genomów dwóch wirusów (MAstV-1 i CDV), natomiast nie podała informacji o długości genomów dwóch pozostałych wirusów (AMDV i SARS-Cov-2). Informacje te zawarto w kolejnych rozdziałach, ale dla zachowania porządku, umieściłbym je w tym rozdziale. Ponadto, należałoby zwrócić uwagę na zachowanie spójności w określaniu długości genomu wirusów. W pracy podano bowiem, że długość wirusa MAstV-1 to 6,8-7,9 kb, a długość wirusa CDV to 15616. Być może należałoby opisać to drugie jako 15,616 kb?

W kolejnym rozdziale Autorka przedstawiła obszernie, na 3 stronach cel pracy, którym było według Niej: „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.... Podjęto też próbę odpowiedzi na pytanie, czy istnieje możliwość prowadzenia selekcji w kierunku uzyskania zwierząt odpornych.” Poniżej natomiast

podano: „...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”.

Doktorantka postawiła także szereg hipotez badawczych oraz „hipotezę nadrzędną”, zakładającą, że wśród badanych zwierząt znajdują się osobniki, u których występują polimorfizmy molekularne, predysponujące je do odporności na choroby wirusowe. Ponadto przedstawiła działania zmierzające do jej weryfikacji.

Przedstawiony cel/cele oraz hipotezy uważam generalnie za prawidłowo sformułowane, choć można by przedstawić je w formie bardziej skondensowanej. Natomiast wyjaśnienia dotyczące motywów podjęcia badań oraz informacje o materiale badawczym i metodach badań są zbyteczne w tym rozdziale.

Rozdział „Materiał i metody” został bardzo dobrze przygotowany, a przeprowadzone etapy badań szczegółowo opisane. Zawiera następujące podrozdziały: „Materiał biologiczny”, „Diagnostyka serologiczna AMDV za pomocą testu CIEP”, „Analizy molekularne”, „Ocena polimorfizmu pojedynczych nukleotydów (SNP) sekwencji genów *SRSF5*, *RNF165*, *SKOR2*”, „Reakcja sekwencjonowania materiału genetycznego”, „Analiza bioinformatyczna”. Za zaletę założeń metodycznych opisanych badań uważam fakt, że przeprowadzono je zarówno na materiale pobranym od zwierząt hodowlanych, jak i wolnożyjących, co daje pełniejszy obraz polimorfizmu odporności gatunku, a nie tylko populacji hodowlanej. Ponadto uważam, że w badaniach wykorzystano wystarczającą liczbę prób materiału biologicznego, a wybrane metody badawcze były właściwe.

W rozdziale „Wyniki” Doktorantka przedstawiła przebieg badań i uzyskane rezultaty. Wyniki można podzielić na wstępne, dotyczące przygotowań do badań, izolacji DNA, optymalizacji warunków termicznych reakcji PCR, sekwencjonowania oraz właściwe, w których przedstawiono badania polimorfizmu genów: *SRSF5*, *RNF165* i *SKOR2*. Autorka oparła się przy wyborze genów do swoich badań na wynikach publikacji Karimi i wsp. (2012a), którzy zidentyfikowali geny mogące pełnić rolę prognostycznych wskaźników odpowiedzi immunologicznej nerek na obecność wirusa choroby aleuckiej, sugerując, że geny *SRSF5*, *RNF165*, *SKOR2* są silnymi kandydatami do selekcji nerek tolerujących chorobę aleucką. Gen *SRSF5* uczestniczy w procesach splicingu RNA, które mogą mieć kluczowe znaczenie w regulacji ekspresji genów zaangażowanych w odpowiedź przeciwwirusową. Gen *RNF165*, poprzez swoją aktywność jako ligaza ubikwitynowa, może wpływać na degradację białek wirusowych, natomiast *SKOR2* 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 nerek 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 różnicowanie 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. W genie SKOR2 stwierdzono występowanie negatywnego efektu funkcjonalnego polimorfizmu 3000A>T(p.K1000N) oraz neutralnego w odniesieniu do polimorfizmu 3017A>G (p.H1006R). Przedstawione w rozprawie wyniki uważam, za bardzo cenne naukowo. Pozwolą zapewne Autorce na przygotowanie na ich podstawie kilku wartościowych publikacji naukowych. Badania polimorfizmów sekwencji DNA u nerek hodowlanych oraz dziko żyjących dostarczają cennych informacji na temat różnorodności genetycznej tych grup zwierząt, a także pozwalają na zrozumienie wpływu zmienności genetycznej na funkcjonalność białek, takich jak SRSF5, RNF165 oraz SKOR2. Zidentyfikowane polimorfizmy w sekwencjach badanych genów wskazują na obecność zmienności genetycznej w obu grupach nerek. Wyniki ocenianych badań 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. Generalnie Doktorantka wywiązała się w ocenianym rozdziale z zadania czytelnego przedstawienia uzyskanych skomplikowanych wyników badań. Mam jedynie uwagę o charakterze technicznym, proszę o zastanowienie, czy podrozdział 4.2. „Optymalizacja warunków termicznych reakcji PCR” nie powinien znaleźć się w rozdziale „Materiał i metody”?

W rozdziale „Dyskusja” w interesujący sposób zinterpretowano uzyskane wyniki badań własnych na tle osiągnięć innych badaczy. Uważam ten rozdział za dobrze przygotowany, mam jedynie drobne uwagi o charakterze polemicznym. Przykładowo, w pierwszym akapicie (str. 107) Autorka interpretuje fakt występowania większej różnorodności genetycznej u nerek hodowlanych w porównaniu z norkami dzikimi jako następstwo selekcji w procesach hodowlanych. Oczywiście, powyższa interpretacja jest prawdopodobnie prawidłowa, należałoby jednak, w ramach uzupełnienia powyższego stwierdzenia, dopisać możliwość występowania presji naturalnej selekcji w populacjach wolnożyjących na ograniczanie występowania pewnych

polimorfizmów (np. w genie SRSF5). Na stronie 120 znajduje się tekst („Zmiana w strukturze i funkcji...”), który bardziej nadaje się do rozdziału „Przegląd piśmiennictwa”, gdyż jest wprowadzeniem do problematyki badań nad genem SKOR2 i jego białkiem. Akapit ten nie nawiązuje bezpośrednio do wyników uzyskanych przez Autorkę.

W rozdziale „Podsumowanie i wnioski” Doktorantka sformułowała 10 dość obszernych wniosków spójnych tematycznie z zakresem przeprowadzonych badań. Jednak odnoszę wrażenie, że podobnie jak w streszczeniu, Autorka nie pokusiła się o całościowe podsumowanie uzyskanych – interesujących wyników, co być może zostanie jeszcze dokonane w publikacjach, które powstaną na podstawie ocenianej dysertacji. Mam pewne wątpliwości, co do sformułowania wniosku 1, który jest raczej zdaniem o charakterze ogólnym, podsumowującym badania. Proszę także o refleksję czy pierwsze zdanie wniosku 9 jest niezbędne. Natomiast za najcenniejszy z praktycznego punktu widzenia, dający nadzieję na ogromne hodowlano-selekcyjne możliwości, wydaje się wniosek 10, zawierający przypuszczenie, że mutacja typu SNP w sekwencji kodującej genu *SKOR2* 3017A>G (p.H1006R) występuje wyłącznie u norek dzikich, co można powiązać, zdaniem Doktorantki, z podwyższoną odpornością tej grupy zwierząt na infekcje wirusem AMD. Czy jednak nie jest to jedynie domniemanie, które powinno być zweryfikowane w praktyce? Uważam, że to zagadnienie powinno zostać szerzej rozwinięte podczas ostatecznego redagowania pracy.

Obszerna licząca 198 pozycji, głównie anglojęzycznych, „Bibliografia” została dobrze dobrana i umiejętnie wykorzystana w poszczególnych częściach ocenianej rozprawy.

Korzystając z przywileju recenzenta oraz w trosce o jakość publikacji naukowych, które powstaną w oparciu o ocenianą dysertację, przedstawiam swoje uwagi i dostrzeżone nieścisłości. Pragnę oświadczyć, że nie wpływają one na moją ogólną pozytywną ocenę pracy.

Ponieważ praca dotyczy dość skomplikowanych badań genetycznych i zawiera znaczną liczbę fachowych zwrotów, w tym anglojęzycznych, sugerowałbym umieszczenie na jej początku „słowniczka” skrótów i terminów, co znacznie ułatwiłoby jej odbiór. Dobrym przykładem jest słowo „scaffold”, które w pracy bywa zastępowane bezpośrednim polskim tłumaczeniem jako „rusztowanie”.

W całej pracy należałoby zastosować jednolite nazewnictwo angielskojęzycznych skrótów wirusów w połączeniu z językiem polskim. Przykładem może być skrót nazwy wirusa choroby aleuckiej, który pojawia się zarówno w wersji „wirus AMD”, „wirus AMDV”. Proszę o wyjaśnienie, co Autorka miała na myśli pisząc: „fenotyp przeżycia” (str. 29).

Należałoby także poprawić w tekście pewne niezręczności językowe, np.: str. 23 - pierwsze zdania pierwszego i drugiego akapitu są bardzo podobne, str. 25 - powinno być „test jodowy”, str. 78 – brak podpisu ryc. 25, str. 28. - „zdziczała populacja”?, str. 124 – „sztuczna

hodowla”.

Rozpoczynając końcową ocenę, stwierdzam, że praca jest obszerna, starannie przygotowana i dobrze zilustrowana rycinami. Stanowi próbę oryginalnego rozwiązania ważnego problemu badawczego – selekcji nerek w kierunku odporności na choroby wirusowe, stosując zawansowane metody naukowe. Uzyskane wyniki mają wartość zarówno naukową, jak i praktyczną. Poruszają ważny dla hodowców aspekt kryteriów selekcji zdrowotnej zwierząt i w konsekwencji poprawy ich dobrostanu. Wpisują się tematycznie w dyscyplinę naukową zootechnika i rybactwo, ale co należy podkreślić i pochwalić, mają także wątek interdyscyplinarności, dotyczą bowiem również zagadnień związanych z medycyną weterynaryjną i szeroko pojmowaną biologią. Należy uznać, że dysertacja zawiera elementy nowatorskie, bowiem po raz pierwszy w kraju dokonano tak kompleksowej oceny polimorfizmu genów odpowiedzialnych za odporność na chorobę aleucką u nerek. Uzyskane wyniki podnoszą ogólny stan wiedzy dotyczącej badanych zagadnień oraz mogą być inspiracją do dalszego zgłębiania tych zagadnień do czego, zważywszy na istotność problemu, serdecznie zachęcam.

Uważam ponadto, że Doktorantka podczas przygotowywania ocenianej rozprawy wykazała się znaczną wiedzą i umiejętnościami organizowania i prowadzenia zaawansowanych badań i analiz naukowych.

Na tej podstawie stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Ilony Mazurkiewicz pt.: „Polimorfizm molekularny genów odporności na choroby wirusowe u norki amerykańskiej (*Neovison vison*)”, wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Andrzeja Jakubczaka w Instytucie Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej, Wydziału Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki w Uniwersytecie Przyrodniczym w Lublinie spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (tj. Dz. U. z 2022 r. poz. 574) i może być podstawą do nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo.

Przedstawiam zatem Wysokiej Radzie Naukowej Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie wniosek o dopuszczenie mgr Ilony Mazurkiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem


prof. dr hab. Andrzej Gugolek