

O C E N A

rozprawy doktorskiej mgr Anny Marii Majewskiej

pt.: „Analiza zmienności sekwencji nukleotydowej genu receptora kinazy tyrozynowej kotów rasy ragdoll”, wykonanej w Katedrze Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Marka Kmiec

W naukach biologicznych istnieje stałe i uzasadnione zainteresowanie badaczy wyjaśnieniem związku między genotypem zwierzęcia a markerami jego umaszczenia. W zasobach wyników badań istnieje obecnie spora pula genów kandydujących, mogących mieć bezpośredni lub pośredni wpływ na zmienność w zakresie barwy umaszczenia różnych gatunków i ras zwierząt. Z aktualnego przeglądu piśmiennictwa wynika, iż poznano dotychczas ponad 150 genów związanych z syntezą pigmentów i wzorów ubarwienia. Należą do nich geny kodujące syntezę melaniny, związane z biologią melanocytów oraz melanosomów, a także migracją i przetrwaniem melanocytów podczas ich transportu. Gen receptora kinazy tyrozynowej (c-kit), związany jest z rolą omówionej powyżej, ostatniej grupy genów. Wpływ zmienności tego genu na występowanie różnej wielkości białych obszarów i znaczeń na powierzchni futra niektórych gatunków zwierząt, została częściowo potwierdzona, jednak nie wyjaśniono dotąd związków między wariantami genetycznymi genu c-kit a barwą futra kotów.

Dla Autorki niniejszej dysertacji, brak wyników badań w tym obszarze stał się przesłanką do podjęcia badań nad zmiennością sekwencji nukleotydowej genu c-kit kotów rasy ragdoll, a także po jego określeniu, do porównania osobników posiadających określony wzór wielkości białych obszarów powierzchni futra

z określonym w badaniach składem nukleotydowym genu c-kit kotów rasy ragdoll, w istniejących 3 typach odmiennego umaszczenia tej rasy (colourpoint, colourpoint mitted, colourpoint bicour).

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska zawiera 169 stron tekstu, 49 tabel, 39 wykresów, 46 rycin (fotografii) oraz 140 pozycje piśmiennictwa. Ponadto, przed wstępem na stronach 4-10 zawarto spis treści, streszczenia pracy w językach polskim oraz angielskim, a także wykaz zastosowanych skrótów.

Tytuł pracy „Analiza zmienności sekwencji nukleotydowej genu receptora kinazy tyrozynowej kotów rasy ragdoll”, prawidłowo odzwierciedla główny obszar i cel badań.

Wstęp rozprawy liczy 27 stron. Jest interesujący, choć miejscami zbyt długi. Potrzeby podjętych badań nie uzasadniały tak szczegółowego i miejscami popularnonaukowego opisu historii pochodzenia kota domowego oraz jego znaczenia w życiu człowieka. Dla zrealizowania podjętego w niniejszej pracy tematu, wystarczyłby opis pochodzenia oraz charakterystyka kotów rasy ragdoll. Dalsze podrozdziały wstępu, poświęcone przeglądowi piśmiennictwa w obszarze badań roli receptora kinazy tyrozynowej oraz polimorfizmu jego genu związanego z umaszczeniem zwierząt, są już prawidłowe, interesujące, napisane dobrym, klarownym i zwięzłym językiem naukowym. Te podrozdziały dowodzą, iż Doktorantka dobrze dobrała przeglądane piśmiennictwo, które w tym zakresie jest naprawdę obszerne i aktualne. Przegląd wielu źródeł doprowadził Autorkę do przedstawienia głównej przesłanki uzasadniającej podjęcie badań, tj. do sformułowania hipotezy, iż istnieje znaczące prawdopodobieństwo, że zmienność nukleotydowa genu c-kit ma związek z występowaniem charakterystycznego rozmieszczenia białych obszarów umaszczenia kotów ragdoll odmian *colour mitted* oraz *bicour*.

Cel pracy sformułowany na podstawie omawianych wyżej przesłanek, przewidywał przede wszystkim wykrycie miejsc polimorficznych genu c-kit z próbek krwi badanych trzech odmian barwnych kotów, zaprojektowanie testów umożliwiających analizę zidentyfikowanych *loci*, a także na podstawie uzyskanych wyników zbadanie struktury genetycznej typów umaszczenia oraz przeanalizowanie związku między rozkładem genotypów c-kit a odmianami barwnymi umaszczenia

kotów ragdoll. Ostatni z wyznaczonych celów polegał na określeniu znaczenia uzyskanych wyników dla wiedzy z zakresu genetyki.

Rozdział „Materiał i metody” liczy 14 stron. Materiał badawczy stanowiły próby krwi i tkanek (jajników, jąder) pochodzące od 96 kotów rasy ragdoll z 18 hodowli z terenu Polski (15 osobników odmiany *colourpoint*, 46 odmiany *colour mitted* oraz 35 kotów *colourpoint bicour*). Sekwencjonowanie genu *c-kit* metodą Sangera w celu wykrycia w nim ewentualnych mutacji wykonano na próbkach krwi uzyskanych od grupy 12 kotów, która składała się z 3 odmian barwnych reprezentowanych przez 4 osobniki każdego typu. Ogółem zsekwencjonowano 20 odcinków genu *c-kit* z próbek 12 kotów ragdoll, przy czym ustalono sekwencję nukleotydową wszystkich 21 eksonów tego genu. Autorka postanowiła także włączyć do analizy wyników ważne wg Niej mutacje opisane w literaturze: Glovonig oraz dwie insercje intronu 1 genu *c-kit*. Dla każdej zidentyfikowanej w niniejszej pracy nowej mutacji Autorka zaprojektowała test na jej oznaczenie. W tym celu wykorzystano następujące techniki wykrywania mutacji oparte o reakcję PCR: PCR-RFLP, ACRS-PCR (amplification created restriction sites PCR) oraz AS-PCR (allele specific PCR). Do analizy restrykcyjnej oraz projektowania starterów wykorzystano odpowiednio programy NEBCutter i RestrictionMapper oraz Primer3. Analizę statystyczną dotyczącą charakterystyki genetycznej poszczególnych odmian barwnych kotów ragdoll oraz ich porównanie wykonano przy pomocy pakietu PQStat ver. 1.6. W ramach analizy statystycznej obliczono frekwencje poszczególnych genotypów, związek między rozkładem wykrytych *loci* a typami barwnymi, równowagę Hardy-Weinberga oraz oszacowano dystanse genetyczne i wskaźniki zmienności, a także wzajemną relację między rozkładem genotypów poszczególnych *loci*. Do oszacowania związku między rozkładem genotypów poszczególnych *loci* a typami umaszczenia kotów ragdoll wykorzystano test niezależności Pearsona χ^2 oraz dokładny test Fishera.

Dział „Wyniki” liczy 91 stron. W wyniku sekwencjonowania porównawczego obszernych fragmentów genu receptora kinazy tyrozynowej kotów rasy ragdoll o trzech odmianach barwnych, Autorka zidentyfikowała i opisała 40 polimorfizmów typu SNP. Dla każdego z SNP Doktorantka opracowała test umożliwiający ich wykrycie. 25 z 40 SNP zlokalizowano w intronach genu *c-kit*. W regionie 5'UTR wykryto 2 SNP, zaś w 3'UTR – 4 mutacje. W badanych eksonach wykryto 9 SNP, z

czego tylko jedna zlokalizowana w 4 eksonie genu *c-kit* zmieniała sens zapisu. Dwa z 9 SNP wykrytych w eksonach okazały się wspólne dla wszystkich badanych kotów, tak więc z pewnością nie różnicowały ich umaszczenia. Najbardziej zmiennym eksonem, w których zlokalizowano najwięcej SNP okazał się ekson 3 z trzema SNP. Analiza statystyczna wykazała, że spośród 40 SNP, aż 22 wykazały wysoko istotny związek z typami umaszczenia kotów ragdoll, natomiast dodatkowo 2 SNP miały związek istotny. Trzy z nich zlokalizowano w regionach UTR, 15 w intronach oraz 5 w eksonach, jednak wszystkie miały charakter synonimiczny. Analiza opisanych w piśmiennictwie dwóch insercji w intronie 1 wykazała, że wśród 96 badanych kotów pierwsza z nich była nieobecna, natomiast druga z insercji częściowo obecna. Rozkład genotypów tego *locus* był istotnie związany z typami umaszczenia kotów ragdoll. Z kolei analiza zmienności *locus* *Gloving* w eksonie 6 genu *c-kit* wykazała, że żaden z badanych kotów nie posiadał tej mutacji, uprzednio wykrytej u kotów birmańskich, od których m.in. wywodzi się rasa ragdoll.

Na końcu rozdziału zostały przedstawione dystanse genetyczne między odmianami barwnymi kotów rasy ragdoll. Okazało się, że typy umaszczenia *colourpoint mitted* i *bicolour* są do siebie bardzo zbliżone genetycznie (pod względem sekwencji genu *c-kit*), natomiast *colourpoint* (bez białych oznak) wyraźnie się od nich różni. Oszacowane współczynniki średniej heterozygotyczności wykazały, iż najbardziej zmienną odmianą barwną kotów ragdoll jest *colourpoint mitted*, a najmniej *colourpoint bicolour*.

Rozdział „Dyskusja wyników” liczy 8 stron. Poprawna nazwa tego rozdziału, by uniknąć efektu „masło maślane”, to „Dyskusja”. Pierwszy podrozdział dyskusji jest omówieniem wyników i powinien znaleźć się w rozdziale „Wyniki”.

W ocenianej pracy, największą liczbę SNP wykryto w sekwencjach intronowych. Z uwagi na ten fakt, Autorka skupiła się (bardzo słusznie) na przedyskutowaniu uzyskanych wyników pod kątem podkreślenia znaczenia mutacji intronowych dla efektów biologicznych. Cytowane wyniki (*Nackley i wsp., 2006* oraz *Parmley i Hurst 2007*), wykazały bowiem, że synonimiczność nie musi oznaczać neutralności fenotypowej, a wg *Chorev i Carmal (2012)*, efekt biologiczny może zależeć jak najbardziej od zmienności intronowej, która może skutkować następnie

takimi zjawiskami jak alternatywny splicing sekwencji regulatorowych i motywów wiążących, odmienne odczytywanie kodonów oraz zmianami w drugorzędowej strukturze mRNA (Shablina i wsp., 2006; Parmley i Hurst 2007; Hsu i wsp., 2010; Gingold i Pilpel 2011). Z licznie cytowanego w dyskusji piśmiennictwa wynika jasno, iż obecnie rośnie ranga niedocenianej do niedawna zmienności zlokalizowanej poza eksonami i granicami ekson-intron, zatem rośnie w tym zakresie wartość wyników uzyskanych w niniejszej pracy. W dalszej części dyskusji Autorka podkreśliła, że mimo, iż rozkład genotypów w żadnym z wykrytych *loci* nie wykazał pełnej korelacji z typami umaszczenia kotów tej rasy, badany gen kinazy tyrozynowej uzyskał w efekcie badań wsparcie jako gen kandydujący do wpływu modyfikującego wielkość i rozkład białych obszarów w umaszczeniu kotów ragdoll. Autorka podkreśliła, iż Jej badania mają charakter pionierski na gruncie genomiki strukturalnej kotów, bowiem dotąd nikt nie wiązał zmienności w genie *c-kit* z rozmieszczeniem białych obszarów na okrywie futrzanej kotów. W konkluzji Doktorantka stwierdziła, że badania powinny być kontynuowane na liczniejszym materiale zwierzęcym i dotyczyć sekwencjonowania całego genu kinazy tyrozynowej.

W rozdziale „Podsumowanie i wnioski” , podsumowanie mieści się w punktach 1-3 oraz 5, które stanowią rekapitulację wyników. Jedynie punkty 4 i 6 noszą znamiona wniosków wysnutych z wyników pracy. Wniosek 4 powinien być pierwszym, natomiast 6 – drugim. Należało także wspomnieć we wnioskach o ważnym fakcie, iż badania nie rozstrzygnęły jednoznacznie o związku genu *c-kit* z różnicami w umaszczeniu 3 typów tej rasy oraz o stwierdzonym w pracy braku mutacji *Gloving* u kotów ragdoll, a tym samym o interesującym braku (w tym zakresie) pokrewieństwa z rasą birmańską.

Kończący pracę rozdział „Wykaz piśmiennictwa”, zawiera 140 źródeł bardzo dobrze dobranej literatury. Rozdział ten zgodnie ze wzorcem klasycznym pracy badawczej, powinien nazywać się „Piśmiennictwo” lub „Literatura”, albo „Źródła”.

Reasumując, należy uznać, że zakres wykonanych prac i analiz molekularnych związanych z sekwencjonowaniem, wykonaniem analizy bioinformatycznej oraz statystycznej w niniejszej dysertacji był bardzo szeroki. Uzyskane, interesujące z naukowego punktu widzenia wyniki zostały szczegółowo

opisane i zilustrowane w pracy. Szczególnie interesujące okazały się wyniki ujawniające szeroki polimorfizm tego genu u kotów ragdoll, bowiem u 12 badanych kotów wykryto aż 40 polimorfizmów typu SNP, wśród których jedna z substytucji wykryta w eksonie zmieniała sens zapisu genetycznego. Realizując wszystkie postawione sobie cele pracy, Autorka odniosła w tym zakresie sukces naukowy, a uzyskane wyniki wnoszą do nauki zarówno walory poznawcze jak i aplikacyjne. Należy podkreślić, iż w procesie pisania ocenianej pracy, Autorka wykazała się wiedzą, inteligencją oraz wielką pracowitością. W pełni opanowała warsztat naukowy i wykazała biegłość zarówno w pracy laboratoryjnej jak i w ocenie statystycznej uzyskanych wyników.

Zawarte w powyższej ocenie pracy doktorskiej uwagi i zalecenia nie umniejszają znaczenia oraz wartości rozprawy, stanowią jedynie życzliwe wskazówki do dalszego doskonalenia warsztatu naukowego Autorki.

Konkludując, stwierdzam że przedstawiona mi do oceny dysertacja doktorska autorstwa Anny Marii Majewskiej, spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim i na tej podstawie zgodnie z art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. „O Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki” (DZ.U. Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami), wnoszę o dopuszczenie mgr Anny Marii Majewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Kosulko', with a long horizontal stroke extending to the right.