



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o
Zwierzętach

mgr Jakub Woźniak

**Identyfikacja markerów genetycznych i epigenetycznych
związanych z występowaniem przepukliny pępkowej świń**

Identification of genetic and epigenetic markers associated with the
occurrence of umbilical hernia in pigs

Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk rolniczych
w dyscyplinie zootechnika i rybactwo
Doctoral dissertation in the field of agricultural sciences
in the discipline of Animal Science

Promotor:
Prof. dr hab. Joanna Nowacka – Woszek
Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli
Zwierząt

Poznań, 2025

*Pragnę złożyć najserdeczniejsze podziękowania **prof. dr hab. Joannie Nowackiej – Woszuk** promotorowi mojej pracy, za możliwość podjęcia współpracy, nieocenioną opiekę naukową, ogromną życzliwość, cierpliwość, poświęcony czas oraz przekazaną wiedzę.*

*Wyrazy wdzięczności kieruję również do **obecnych i byłych pracowników oraz doktorantów Katedry Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt** — w szczególności tych z pokoju 44 — za stworzenie przyjaznej atmosfery pracy oraz udzielone wsparcie.*

*Szczególne podziękowania składam osobom, bez których ta praca nigdy by nie powstała — mojej **Mamie Katarzynie, Tacie Albertowi oraz Dziadkom: Lucynie, Janinie i Stefanowi**. To Oni byli i są ze mną w najtrudniejszych momentach, otaczając mnie wsparciem i nieustannie we mnie wierząc.*

W skład cyklu stanowiącego rozprawę doktorską wchodzi dwa opublikowane artykuły naukowe:

1. Wozniak, J., Loba, W., Iskrzak, P., Pszczola, M., Wojtczak, J., Switonski, M., & Nowacka-Woszek, J. (2023). A confirmed association between DNA variants in *CAPN9*, *OSM*, and *ITGAM* candidate genes and the risk of umbilical hernia in pigs. *Animal Genetics*, 54(3), 307–314. <https://doi.org/10.1111/age.13307>
Punkty MNiSW=140, 5-letni Impact Factor=2,6
2. Wozniak, J., Loba, W., Wysocka, A., Dzimira, S., Prządka, P., Switonski, M., & Nowacka-Woszek, J. (2023). Altered transcript levels of *MMP13* and *VIT* genes in the muscle and connective tissue of pigs with umbilical hernia. *Genes*, 14(10), 1903. <https://doi.org/10.3390/genes14101903>
Punkty MNiSW=100, 5-letni Impact Factor=3,3

oraz omówienie wyników trzeciego maszynopisu złożonego do redakcji BMC Genomics (aktualny status pracy – w recenzji)

3. Wozniak, J., Szabelska-Berezewicz, A., Zyprych-Walczak, J., Niemyjski, R., Dudek, K., Stachowiak, M., & Nowacka-Woszek J. (2025 – złożona do BMC Genomics). Genetic and epigenetic markers in the *METTL21C* gene associated with umbilical hernia in pigs.

Praca zawiera omówienie badań.

Praca finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu OPUS nr. 2019/33/B/NZ9/00654 (Kierownik: prof. dr hab. Joanna Nowacka – Woszek)

Spis treści

1. Wykaz skrótów	7
2. Streszczenie.....	8
3. Abstract	9
4. Wprowadzenie.....	10
4.1 Charakterystyka problemu badawczego i jego znaczenie	10
4.1.1 Znaczenie produkcji trzody chlewnej w sektorze rolniczym	10
4.1.2 Wpływ rozwoju genetyki na produkcję trzody chlewnej	11
4.1.3 Wpływ przepukliny pępkowej świń na produkcję i dobrostan zwierząt	12
4.2 Przyczyny rozwoju przepukliny pępkowej	13
4.2.1 Przepuklina pępkowa u różnych gatunków	16
4.2.2 Badania nad genetycznym podłożem przepuklin pępkowych świń	17
4.2.2 Problemy związane z badaniami nad przepukliną pępkową	22
5. Hipotezy i cele badań	24
5.1 Eksperyment 1	24
5.2 Eksperyment 2	25
5.3 Eksperyment 3	26
5.3 Eksperyment dodatkowy	27
6. Materiał i metody badawcze	28
6.1 Eksperyment 1	28
6.1.1 Zwierzęta wykorzystane w badaniu, pobrane tkanki oraz izolacja DNA	28
6.1.2 Analiza sekwencjonowania metodą Sangera	29
6.1.3 Analiza występowania CNV	30
6.1.4 Analiza statystyczna	31
6.2 Eksperyment 2	31
6.2.1 Zwierzęta wykorzystane w badaniu, pobrane tkanki oraz izolacja DNA i RNA	31
6.2.2 Analiza poziomu mRNA	32
6.2.3 Analiza poziomu metylacji DNA	33
6.2.4 Analiza statystyczna	33
6.3 Eksperyment 3	34
6.3.1 Zwierzęta wykorzystane w badaniu, pobrane tkanki oraz izolacja DNA, RNA i białka	34
6.3.2 Analiza sekwencjonowania RNA	35
6.3.3 Analiza bioinformatyczna wyników z RNA-seq	35
6.3.4 Weryfikacja wyników z RNA-seq metodą PCR w czasie rzeczywistym	36
6.3.5 Analiza metylacji DNA z wykorzystaniem pirosekwencjonowania	37

6.3.6 Analiza sekwencji regionów 5'-flankujących metodą Sangera.....	39
6.3.7 Analiza wariantów DNA zidentyfikowanych w RNA-seq metodą Sangera	40
6.3.8 Analiza liczby kopii wybranych genów metodą ddPCR	41
6.3.9 Analiza poziomu białka metodą western-blot	42
6.3.10 Analiza statystyczna	43
6.4 Eksperyment dodatkowy	44
6.4.1 Opis zwierząt, pobranych tkanek oraz izolacja DNA	44
6.4.2 Analiza sekwencjonowania z wykorzystaniem techniki Sangera	45
6.4.3 Analiza statystyczna	47
7. Wyniki	48
7.1 Eksperyment 1	48
7.1.1 Związek wariantów DNA w genach <i>CAPN9</i> , <i>OSM</i> i <i>ITGAM</i> z występowaniem przepukliny pępkowej świń.....	48
7.1.2 Analiza haplotypów.....	48
7.1.3 Analiza liczby kopii genu <i>NUGGC</i>	49
7.1.4 Znaczenie wyników	49
7.2 Eksperyment 2.....	50
7.2.1 Istotne różnice w poziomach transkryptów genów <i>MMP13</i> i <i>VIT</i> , u zwierząt z przepukliną pępkową	51
7.2.2 Analiza poziomu metylacji DNA	51
7.2.3 Zidentyfikowane różnice w poziomie transkryptów genów u zwierząt z przepukliną pachwinową	52
7.2.4 Znaczenie wyników	52
7.3 Eksperyment 3.....	54
7.3.1 Analiza różnicowa transkryptomów	54
7.3.2 Analiza wzbogacenia funkcjonalnego szlaków biologicznych	58
7.3.3 Poziom mRNA wybranych genów.....	60
7.3.4 Poziomu metylacji DNA	62
7.3.5 Analiza polimorfizmów DNA	66
7.3.6 Zmienność liczby kopii	67
7.3.7 Poziom białka.....	68
7.3.8 Analiza frekwencji wariantów DNA wytypowanych w RNA-seq.....	69
7.3.9 Znaczenie wyników	70
7.4 Eksperyment dodatkowy	71
7.1.1 Związek zaobserwowanych wariantów DNA w genach <i>MYO19</i> , <i>MYH2</i> , <i>MYH8</i> , <i>ZNF646</i> i <i>ZNF713</i> z występowaniem przepukliny pępkowej świń	71
7.1.4 Znaczenie wyników	76
8. Dyskusja.....	78

8.1 Markery genetyczne związane z występowaniem przepuklin pępkowej.....	78
8.2 Wpływ różnic w poziomie transkryptów na występowanie przepukliny pępkowej w różnych typach tkanek	81
8.3 Kompleksowa analiza genetycznego podłoża przepukliny pępkowej świń: analiza transkryptomoczną i epigenomiczną.....	84
9. Podsumowanie dyskusji i wnioski	89
10. Literatura	94
11. Spis tabel i rycin.....	106

1. Wykaz skrótów

- GWAS – (ang. *genome-wide association studies*) – analizy asocjacyjne całego genomu
- CNV – (ang. *copy number variation*) – zmienność liczby kopii
- ddPCR – (ang. *droplet digital PCR*) – emulsyjno-cyfrowa reakcja łańcuchowa polimerazy
- DEGs – (ang. *differently expressed genes*) - geny o zróżnicowanej ekspresji
- FDR – (ang. *false discovery rate*) – współczynnik fałszywych odkryć
- GO – (ang. *gene ontology*) – ontologia genów
- p-value – (ang. *probability value*) – wartość prawdopodobieństwa
- padj. – (ang. *adjusted p-value*) – skorygowana wartość prawdopodobieństwa
- PCR – (ang. *polymerase chain reaction*) – łańcuchowa reakcja polimerazy
- PCR-RFLP – (ang. *polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism*) – łańcuchowa reakcja polimerazy - polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych
- RIN – (ang. *RNA Integrity Number*) – wskaźnik integralności RNA
- RNA-seq – (ang. *RNA sequencing*) – sekwencjonowanie RNA
- QTL – (ang. *quantitative trait loci*) – loci cech ilościowych
- SNP – (ang. *single nucleotide polymorphism*) – polimorfizm pojedynczego nukleotydu
- UH – (ang. *umbilical hernia*) – przepuklina pępkowa
- UTR – (ang. *untranslated region*) – region nie podlegający translacji

2. Streszczenie

Przepuklina pępkowa świń jest jedną z najczęściej występujących wad rozwojowych w produkcji trzody chlewnej, prowadząca do poważnych strat ekonomicznych oraz pogorszenia dobrostanu zwierząt. Pomimo wielu przeprowadzonych badań, etiologia tej wady nadal nie została w pełni wyjaśniona, co utrudnia wdrożenie skutecznych działań hodowlanych. Praca doktorska koncentruje się na identyfikacji markerów genetycznych i epigenetycznych związanych z ryzykiem występowania przepukliny pępkowej świń. Do badań wykorzystano próbki pochodzące od świń będących mieszańcami różnych ras, podzielonych na dwie grupy – osobniki u których zaobserwowano przepuklinę pępkową oraz osobniki kontrolne (bez przepukliny). Zastosowano metody klasyczne (sekwencjonowanie Sangera, ddPCR, PCR w czasie rzeczywistym), jak i nowoczesne techniki biologii molekularnej i bioinformatyki (sekwencjonowanie RNA-seq czy analiza metylacji DNA poprzez pirosekwencjonowanie).

W ramach uzyskanych wyników wykazano m.in. związek pomiędzy wariantami w genach *CAPN9*, *OSM*, *ITGAM* a ryzykiem wystąpienia przepukliny. Zidentyfikowano także różnice w poziomie ekspresji genów *MMP13* i *VIT*. W badaniu z wykorzystaniem RNA-seq po raz pierwszy wykonano analizę wyłącznie dla tkanki mięśniowej pochodzącej z pierścienia pępkowego i zidentyfikowano potencjalne geny kandydujące zróżnicowane pod względem poziomu ekspresji pomiędzy badanymi grupami. Najciekawsze wyniki uzyskano dla genu *METTL21C*, dla którego stwierdzono zmieniony poziom mRNA oraz zróżnicowanie pod względem metylacji DNA, a dodatkowo zidentyfikowano wariant DNA w regionie regulatorowym tego genu, mogący wpływać na przyłączanie czynników transkrypcyjnych i potencjalnie regulować jego poziom transkryptu.

Przeprowadzone badania poszerzyły dotychczasową wiedzę odnośnie molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój przepukliny pępkowej świń, podkreślając zarówno rolę wariantów genetycznych, jak i regulacji epigenetycznej. Wyniki mogą w przyszłości posłużyć do opracowania markerów selekcyjnych oraz strategii hodowlanych mających na celu ograniczenie występowania tej wady w populacjach trzody chlewnej.

3. Abstract

Umbilical hernia is one of the most frequently occurring developmental defect in pigs, leading to significant economic losses and influencing animal welfare. Despite numerous studies, the etiology of this defect has not yet been fully explained, making it difficult to implement effective breeding strategies. This doctoral thesis focuses on the identification of genetic and epigenetic markers associated with the risk of umbilical hernia in pigs. The study utilized samples from pigs that were crossbreeds of various breeds, divided into two groups – individuals with observed umbilical hernia and control individuals (without hernia). Both, classical methods (Sanger sequencing, ddPCR, real-time PCR) and modern molecular and bioinformatics techniques (RNA-seq sequencing and DNA methylation analysis through pyrosequencing) were applied.

The obtained results revealed, among others, associations between variants in the *CAPN9*, *OSM*, and *ITGAM* genes and the risk of hernia occurrence. Differences were also identified in the expression levels of the *MMP13* and *VIT* genes. In the RNA-seq-based study, for the first time, an analysis was performed exclusively on muscle tissue derived from the umbilical ring, identifying potential candidate genes differentially expressed between the examined groups. The most interesting findings were obtained for the *METTL21C* gene, which showed altered mRNA level and differences in DNA methylation. Additionally, a DNA variant was identified in the regulatory region of this gene, which may influence on transcription factor binding and potentially regulate its transcript level.

The conducted research has expanded the existing knowledge about the molecular mechanisms responsible for the development of umbilical hernia in pigs, highlighting the role of both genetic variants and epigenetic regulation. The obtained results may, in the future, contribute to the development of selection markers and breeding strategies aimed at reducing the incidence of this defect in pig populations.

4. Wprowadzenie

4.1 Charakterystyka problemu badawczego i jego znaczenie

4.1.1 Znaczenie produkcji trzody chlewnej w sektorze rolniczym

Produkcja zwierząt gospodarczych odgrywa coraz większą rolę w sektorze rolniczym na całym świecie. Jest to wynik rosnącej w dużym tempie populacji ludzkiej, która prowadzi do zwiększonego zapotrzebowania na produkty pochodzenia zwierzęcego. Hodowla zwierząt niesie ze sobą wiele pozytywnych aspektów, zarówno ekonomicznych, jak i społecznych. Wśród nich możemy wyróżnić wspieranie społeczności wiejskiej poprzez tworzenie nowych miejsc pracy i tym samym przyczynianie się do rozwoju obszarów rolniczych, dostarczanie żywności bogatej w białko oraz potencjalne magazynowanie węgla w środowisku (Rauw i in., 2020).

Wśród różnych zwierząt gospodarskich świnie zajmują istotne miejsce, ze względu na wiele korzyści jakie niesie ich hodowla. W Polsce hodowla świń stanowi istotne wsparcie dla gospodarki wiejskiej. Według danych Głównego Urzędu Statystycznego, na początku czerwca 2024 r. pogłowie trzody chlewnej wyniosło aż 9132 tys. sztuk (Główny Urząd Statystyczny, 2024). Wieprzowina stała się bardzo popularnym mięsem, ceniona zarówno za swoje walory smakowe, jak i jako źródło wysokiej jakości białka zwierzęcego. Jednym z czynników, który przyczynił się do jej popularności na międzynarodowym rynku mięsa, jest krótszy cykl produkcyjny świń w porównaniu do bydła i małych przeżuwaczy. Dodatkowo, usprawnienia produkcyjne związane ze zmianami w zarządzaniu oraz selekcja genetyczna pozwalają na szybkie zwiększenie efektywności produkcji (Nova i González-Schnake, 2014).

Pomimo licznych korzyści, rozwój produkcji trzody chlewnej niesie ze sobą także istotne wyzwania. Kluczowym aspektem staje się konieczność zrównoważenia jakości produkcji mięsa z rosnącym zapotrzebowaniem na ziemię, wodę i energię oraz dbanie o zdrowie i dobrostan zwierząt (Davoli i in., 2008, Rauw i in., 2020, Thorslund i in., 2017). Dla producentów zły stan zdrowia zwierząt może mieć wpływ na wydajność wzrostu, a choroby wynikające z niewłaściwych warunków wymuszają zwiększenie użycia

antybiotyków. Konsumenci z kolei coraz częściej zwracają uwagę na dobrostan zwierząt, traktując go jako kluczowy element jakości produktów spożywczych. W rezultacie są skłonni zapłacić więcej za mięso pochodzące od zwierząt hodowanych w lepszych warunkach (Gomez i in., 2021).

4.1.2 Wpływ rozwoju genetyki na produkcję trzody chlewnej

Genetyka odgrywa kluczową rolę w hodowli zwierząt, poprzez zwiększenie wydajności i jakości produkcji mięsa. Zastosowanie selekcji genetycznej umożliwia poprawę parametrów produkcyjnych, jakości mięsa, zmniejszenie zużycia zasobów, takich jak pasza, a także lepsze przystosowanie zwierząt do zmian klimatycznych (Rauw i in., 2020). Rozwój technologii, wykorzystujących markery DNA, pozwolił na bardziej precyzyjną selekcję zwierząt pod kątem pożądanых cech, w tym jakości mięsa, odporności na choroby czy wydajności reprodukcji (Beuzen i in., 2000).

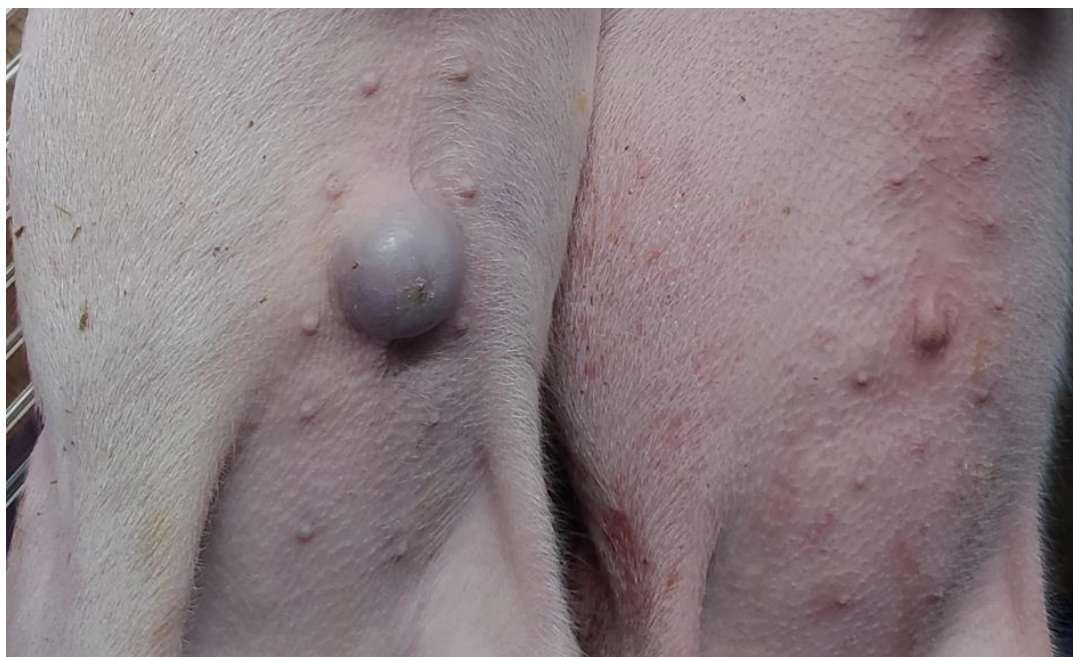
Wśród różnych zwierząt hodowlanych świnie zajmują jedną z najważniejszych pozycji. Ich znaczenie wynika z rozwoju i synergii wielu technologii, w tym genetyki (Rodrigues i in., 2021). Szczególne miejsce w produkcji trzody chlewnej zajmują wysiłki zmierzające do poprawy jakości mięsa. Jest to odpowiedź na rosnące oczekiwania konsumentów dotyczących jego smaku, zdrowotności i wartości odżywczych. Genetyka molekularna oferuje nowe możliwości w osiągnięciu tego celu, umożliwiając analizę zmienności genetycznej na poziomie DNA. Rozwój technologii wykorzystujących markery genetyczne pozwolił na wzbogacenie map genomowych świń oraz identyfikację loci cech ilościowych (QTL; *ang. quantitative trait loci*) (Davoli i in., 2008). W ostatnich latach rozpoczęto również badania z wykorzystaniem narzędzi do edycji genomu w celu przeprowadzenia precyzyjnej modyfikacji genetycznej. Takie podejście może w przyszłości zastąpić tradycyjną selekcję hodowlaną, stanowiącą podstawę nowoczesnego rolnictwa i sprostać nowym wyzwaniom, takim jak rosnąca populacja ludzka oraz zmiany klimatyczne (Whitworth i in., 2022).

Chociaż poprawa jakości mięsa oraz efektywność wykorzystania paszy pozostają priorytetami dla hodowców, w ostatnich latach zaczęto zwracać uwagę na inne aspekty. Badania koncentrują się na poszerzaniu wiedzy na temat chorób utrzymujących się w populacji i prowadzących do znacznych strat ekonomicznych (Roderiques i in., 2021).

Głównym celem jest zatem poznanie genetycznego podłoża takich wad oraz opracowanie metod selekcji, które umożliwią ich ograniczenie lub eliminację. Jednym z najczęściej występujących problemów w produkcji trzody chlewnej są przepukliny pękowe oraz przepukliny pachwinowe i/lub mosznowe (Grindflek i in., 2018).

4.1.3 Wpływ przepukliny pękowej świń na produkcję i dobrostan zwierząt

Przepuklina pękowa (UH; *ang. umbilical hernia*) świń jest jedną z najczęstszych wad wrodzonych występujących u tego gatunku (Savoldi i in., 2021) (Rycina 1). Charakteryzuje się przemieszczeniem zawartości jamy brzusznej, najczęściej jelit, do worka przepuklinowego poprzez pierścień pępkowy (Grindflek i in., 2018, Vigneshwaran i in., 2018). Powstawanie przepukliny pękowej jest wynikiem osłabienia struktur mięśniowych oraz powięziowych wokół pępka, co może być spowodowane zarówno czynnikami wrodzonymi, takimi jak niepełne uformowanie powięzi, jak i nabytymi, np. przewlekłym zwiększeniem ciśnienia wewnątrzbrzusznego lub nadmiernym rozciąganiem tkanek (Coste i in., 2024).



Rycina 1. Porównanie fenotypu zwierzęcia z przepukliną pękową (lewe) i zdrowego osobnika (prawe) (zdjęcie – R. Niemyjski).

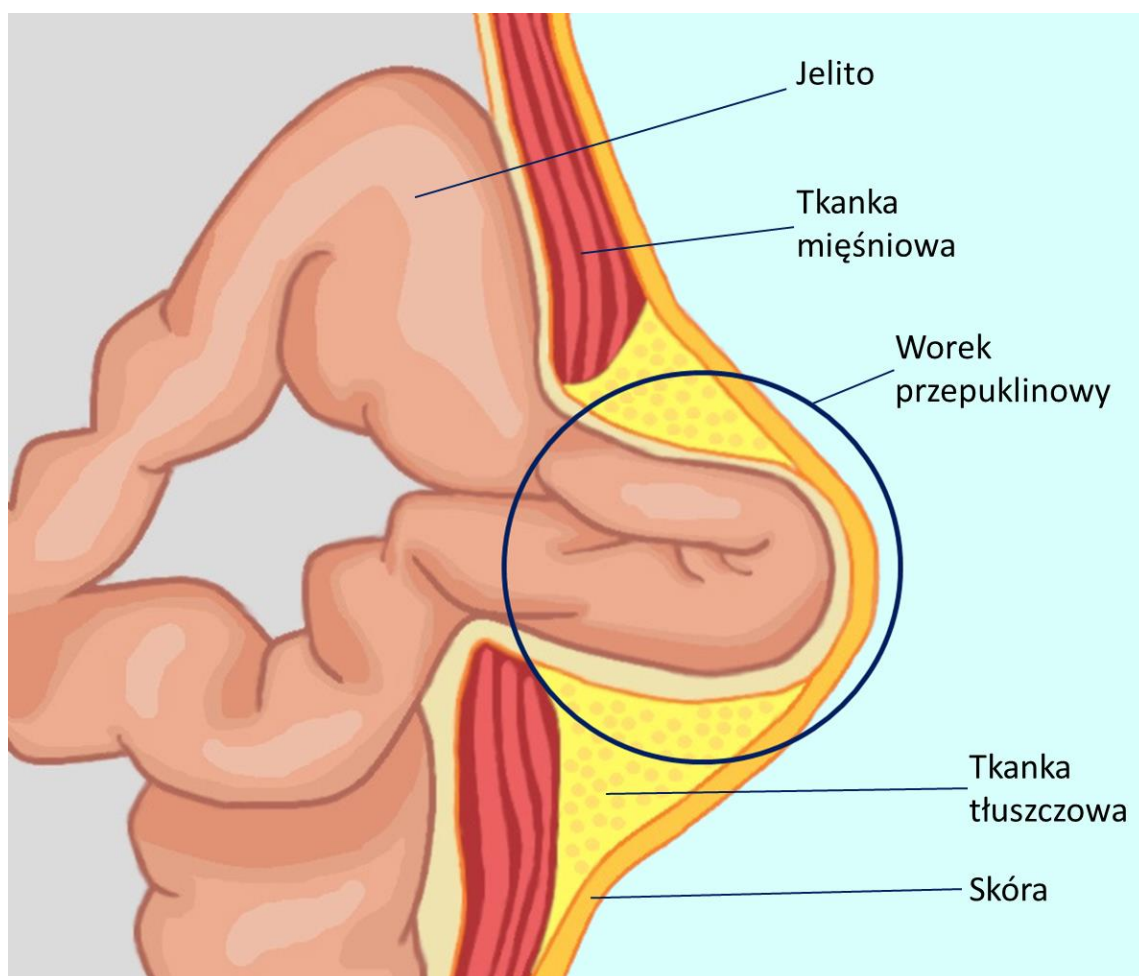
Występowanie tej wady niesie ze sobą wiele negatywnych skutków dla zwierząt. Do najważniejszych należą ból i dyskomfort, które znacząco obniżają jakość życia (Atkinson i in., 2017). Poza widocznym negatywnym wpływem na dobrostan zwierząt, wada ta ma również istotne konsekwencje ekonomiczne. Straty w Unii Europejskiej wynikające z występowania wad wrodzonych u zwierząt gospodarskich szacowane są na około 200 milionów euro rocznie, przy czym przepukliny wraz z wnetrztwem stanowią ponad połowę tej kwoty (Komisja Europejska, 2015). Ma to związek z obserwowanym spadkiem jakości mięsa czy obniżeniem jego wartości rynkowej (Atkinson i in., 2017, Spadola i in., 2022). Przepuklina wpływa również negatywnie na tempo wzrostu zwierząt, zwiększa zachorowalność z powodu infekcji, przyczynia się do wzrostu wskaźnika upadków i wzrostu śmiertelności przed osiągnięciem docelowej wagi. Świnie dotknięte tą wadą mają obniżoną wartość rynkową, a sam proces uboju generuje dodatkowe koszty. Wynika to z konieczności przestojów, dodatkowych zabiegów dezynfekcyjnych i wymogiem oddzielnego uboju, z uwagi na ryzyko zanieczyszczenia tuszy zawartością jelit z przepukliny (Wozniak i in., 2021). Wzrasta także ryzyko skażenia mięsa bakteriami z rodzaju *Salmonella* (Nowacka-Woszek, 2021).

Częstość występowania przepukliny pępkowej świń jest różna w zależności od rasy, populacji oraz systemu produkcyjnego, waha się od 0,4% do 1,2% (Petersen i in., 2008; Searcy-Bernal i in., 1994; Straw i in., 2009). Istnieją jednak w literaturze doniesienia wskazujące na częstość sięgającą 6,7% (Fordyce i in., 2021). Odziedziczalność tej wady jest zróżnicowana i w zależności od źródła oscyluje w zakresie od 0,06 do 0,25 (Searcy-Bernal i in., 1994; Thaller i in., 1996). Wskazuje to, że występowanie przepukliny pępkowej jest przynajmniej częściowo uwarunkowane genetycznie.

4.2 Przyczyny rozwoju przepukliny pępkowej

Pępek (łac. *umbilicus*) jest blizną pozostałą po połączeniu z pępowiną, naturalną strukturą dostarczającą tlen i składniki odżywcze do rozwijającego się płodu i odprowadzającą szkodliwe składniki przemiany materii. Podczas porodu pępowina ulega zerwaniu i następuje jej regresja (Beasley, 2017). Nie jest znana funkcja jaką pępek pełni po porodzie, jednak jego obecność zwiększa ryzyko pojawienia się licznych problemów klinicznych, zarówno wrodzonych jak i nabytych (Khati i in., 1998).

Przepuklina pępkowa powstaje na skutek przedostania się zawartości jamy brzusznej przez jej ściany w okolicy pępka tworząc podskórne uwypuklenie – worek przepuklinowy wyścielony otrzewną (Beasley, 2017) (Rycina 2). W budowie tej struktury możemy wyróżnić dwie części. Na pierwszą składa się zbudowany z mięśni pierścień przepuklinowy, przez który przedostaje się zawartość jamy brzusznej. Drugą część stanowi worek zbudowany ze skóry i otrzewnej (Doijode, 2019). Powszechnie uważa się, że osłabione mięśnie z okolicy pępka u zwierzęcia powodują, że otwór pępkowy nie zamyka się prawidłowo (Grindflek i in., 2018). Poza przedostaniem się części jelit do worka przepuklinowego, mogą występować współistniejące zakażenia pozostałości pępowinowych lub części zewnętrznej pępka (Beasley, 2017).



Rycina 2. Schemat budowy ściany brzucha i powstałej przepukliny pępkowej (na podstawie Williams D. F., 2023).

Przepuklina może być wrodzona bądź nabyta (Doijode, 2019), jednakże bezpośrednie przyczyny powstawania tej wady nie są jeszcze dobrze poznane. Geneza przepukliny jest złożona i wynika z interakcji czynników środowiskowych, genetycznych oraz metod zarządzania hodowlą (Fordyce i in., 2021). Elementy takie jak urazy fizyczne, wysokie ciśnienie w jamie brzusznej czy infekcje sprzyjają powstawaniu przepukliny (Grindflek i in., 2018). Wskazuje się także na komplikacje podczas porodu, ssanie pępowiny przez inne prosięta czy osłabienie mięśni brzucha (Spadalo i in., 2022). Innym kluczowym aspektem jej rozwoju, który jest wskazywany jako potencjalna przyczyna, jest metabolizm kolagenu, białka kluczowego dla funkcjonowania tkanki łącznej. Jego związek z występowaniem przepukliny został już wcześniej potwierdzony. Zaburzenia w produkcji kolagenu mogą prowadzić do osłabienia tkanek i zwiększonej podatności na urazy, co sprzyja rozwojowi przepukliny (Nowacka-Woszek, 2021; Roderigues i in., 2021; Souza i in., 2020).

Choć czynniki środowiskowe odgrywają istotną rolę, różnice w częstości występowania przepukliny pępkowej wśród ras i linii hodowlanych wskazują na znaczenie wpływu czynników genetycznych (Long i in., 2016). Fakt ten potwierdzają wyniki badań stwierdzające, że wada pojawia się jedynie u części zwierząt przebywających w identycznych warunkach (Searcy-Bernal i in., 1994). Badania sugerują, że za powstawanie przepukliny odpowiada wiele genów i wariantów genetycznych, co wskazuje na poligenowy model dziedziczenia (Nowacka-Woszek, 2021; Savoldi i in., 2021).

W porównaniu do innych rodzajów przepuklin, w przypadku przepukliny pępkowej zaobserwowano silniejszą interakcję między środowiskiem a czynnikami genetycznymi (Spadola i in., 2022). Warunki środowiskowe, takie jak nieprawidłowe rozciąganie pępowiny podczas porodu, nieprawidłowe stosowanie zacisków pępowinowych lub infekcja kikuta pępowinowego, do której doszło z powodu niehigienicznych warunków porodu, mogą przyczyniać się do powstawania wady (Spadola i in., 2022, Straw i in., 2009). Dotychczas były podejmowane próby zidentyfikowania genów i wariantów odpowiedzialnych za jej rozwój, jednak wiedza na temat dokładnych mechanizmów powstawania tej wady pozostaje ograniczona.

4.2.1 Przepuklina pępkowa u różnych gatunków

Przepuklina pępkowa jest wadą występującą nie tylko u świń, ale także u innych zwierząt oraz ludzi, gdzie stanowi poważny problem kliniczny.

Przepuklina pępkowa ludzi obserwowana jest znacznie częściej u kobiet niż u mężczyzn (Kulacoglu, 2018). Wśród dorosłych około 90% przypadków to postać nabyta (Shankar i in., 2017). Wada najczęściej związana jest z otyłością, wodobrzuszem czy ciążami mnogimi (Coste i in., 2024). W większości przypadków wymaga leczenia operacyjnego, jednak obciążone jest to ryzykiem nawrotów (Shankar i in., 2017). U dzieci jest to powszechny defekt, jednak często przebiega bezobjawowo i zazwyczaj ustępuje samoistnie. Dokładna etiologia tej wady nie jest znana, jednak jej występowanie wiąże się z wcześniactwem i niską masą urodzeniową. Obserwowano także wpływ czynników genetycznych (Troullioud Lucas i in., 2024). Zidentyfikowano związek występowania przepukliny pępkowej z trisomią 13, 18 i 21 chromosomu (Troullioud Lucas i in., 2024) czy zespołem Ehlersa-Danlosa (Beighton i in., 1969). Zespół Ehlersa-Danlosa to grupa chorób genetycznych związanych z nieprawidłowościami w budowie tkanki łącznej. W jego patogenezie zidentyfikowano między innymi mutacje w genach *COL5A1* i *COL5A2*, które uczestniczą w produkcji kolagenu (Mao i Bristow, 2001). Ponadto przepukliny pępkowe występują u pacjentów z zespołem Beckwitha-Wiedemanna, który wiąże się ze zmianami metylacji DNA w obszarze podlegającym piętnowaniu genetycznemu w chromosomie 11 (Dagar i in., 2018.).

U bydła przepuklina pępkowa jest najczęściej występującym rodzajem przepukliny, obserwowanym u wszystkich ras, szczególnie w rasie holsztyńsko-fryzyjskiej (Herrmann i in., 2001). Częstość wady szacowana jest na od 1,8% do 15% (Herrmann i in., 2001; Virtala i in., 1996). Jest to defekt, grożący uwięzieniem jelit (Doijode, 2019), czy kolką prowadzącą do śmierci (Distl i in., 2002). Zwierzęta dotknięte przepukliną mają niższą wartość handlową co może stanowić problem ze sprzedażą takich zwierząt na aukcjach (Distl i in., 2002). W przypadku niewielkich przepuklin stosuje się metody zachowawcze, takie jak bandaże, opaski lub wstrzykiwanie substancji drażniących, takich jak chlorek sodu czy cynku mających spowodować obrzęk zapalny, w celu zapobiegnięcia nawrotowi oraz ułatwienia zamknięcia otworu przepuklinowego (Amare i Haben, 2020). Większe przepukliny wymagają jednak leczenia chirurgicznego (Doijode, 2019). Badania przy

wykorzystaniu genotypowania markerów mikrosatelitarnych, przeprowadzone przez zespół Ron i in. (2004) wykazały również obecność istotnego czynnika genetycznego. Potencjalny locus związany z tym defektem został zlokalizowany na chromosomie 8, jednak nie zdołano zidentyfikować konkretnego genu czy mutacji przyczynowej (Ron i in. 2004).

Psy rzadko bywają dotknięte przepukliną pępkową, ale jej obecność również została odnotowana. Wada ta obniża jakość życia, powodując ból i wymioty, dlatego leczenie obejmuje zarówno techniki zachowawcze, jak i zabiegi chirurgiczne. U zwierząt tych postać nabyta jest efektem urazów, infekcji czy naprężeń wynikających z zaparć i biegunk. Zdarzają się jednak także postacie wrodzone (Munif i in. 2024). Wpływ czynnika genetycznego sugeruje częstsze występowanie tego defektu u niektórych ras i linii hodowlanych (Park, 2015).

4.2.2 Badania nad genetycznym podłożem przepuklin pępkowych świń

Dotychczasowe badania nad przepukliną pępkową wykorzystywały metody z zakresu genetyki i bioinformatyki. Główny nacisk położony był na identyfikację genów i wariantów genetycznych związanych z predyspozycją do występowania przepukliny. Odkrycia te mogłyby być przydatne w programach hodowlanych, a także w celu poszerzenia wiedzy na temat mechanizmów molekularnych leżących u podstaw tej wady. Pierwsze badania prowadzone przez między innymi zespoły Knorr i in. (2004), Gatphayak i in. (2007) czy Zhao i in. (2009) w przypadku świń skupiały się na przepuklinach pachwinowych i/lub mosznowych. Warto zauważyć, że ich obraz kliniczny jest podobny do przepuklin pępkowych, co sugeruje możliwość wspólnego podłoża genetycznego.

Jedne z najwcześniej stosowanych metod w badaniach przepuklin świń, to zastosowanie klasycznych technik molekularnych, w tym bazujących na wykorzystaniu enzymów restrykcyjnych. W pracy z 2004 roku, dotyczącej przepuklin pachwinowych, skupiono się na dwóch polimorfizmach w obrębie regionu promotorowego genu *INSL3*. Wykorzystano enzymy restrykcyjne, analizując grupę 223 zwierząt z przepukliną oraz grupę 152 zwierząt kontrolnych. Jednak analiza rozkładu alleli wykluczyła powiązanie badanych polimorfizmów z występowaniem przepukliny (Knorr i in., 2004). Kolejna

publikacja dotycząca genu *INSL3* ukazała się trzy lata później. W tym badaniu zastosowano technikę reakcji łańcuchowej polimerazy z analizą polimorfizmów długości fragmentów restrykcyjnych (PCR – RFLP; ang. *polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism*). Ponownie nie potwierdzono związku polimorfizmów w regionie promotorowym genu *INSL3* z przepukliną pachwinową, jednak zaobserwowano istotne różnice w częstości alleli w grupie badanej w porównaniu z kontrolą dla jednego polimorfizmu znajdującego się w intronie genu *BAX* (Gatphayak i in., 2007). Kolejne badanie dotyczące przepuklin pachwinowych zostało przeprowadzone przez Zhao i in. (2009). Skupiono się na 14 wybranych genach kandydujących. Do identyfikacji polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP; ang. *single nucleotide polymorphism*) użyto reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR; ang. *polymerase chain reaction*) i system MassARRAY wykorzystujący spektrometrię masową. W publikacji wykazano istotny związek wariantów w genach: *HOXA10* (2 warianty w pierwszym intronie), *ZFPM2* (2 warianty w regionie 5'UTR (UTR; ang. *untranslated region*) i 1 w eksonie 9) i *MMP2* (1 wariant w 5'UTR) z przepuklinami, a także potencjalny udział genu *COL2A1* (Zhao i in., 2009).

Postęp w dziedzinie nauki umożliwił wykorzystanie markerów mikrosatelitarnych w poszukiwaniu regionów QTL powiązanych z występowaniem przepuklin. Analiza ta pozwala na identyfikację fragmentów genomu powiązanych z danym fenotypem. Przykładem jest praca Ding i in. (2009), w której analizowano QTL dla przepukliny pępkowej oraz pachwinowej i/lub mosznowej. W badaniu krzyżowano świny ras erhualian i white duroc, uzyskując ostatecznie 1912 osobników potomnych, spośród których 23 świny obciążone były przepukliną pachwinową, a 50 pępkową. Badacze zidentyfikowali regiony na chromosomach 7 i 10 związane z przepukliną pępkową oraz na chromosomie 10 z pachwinową. Wykorzystano 194 markerów mikrosatelitarnych, jednak poza regionami chromosomowymi nie udało się zidentyfikować konkretnych genów kandydujących (Ding i in., 2009).

Wraz z rozwojem technologii sekwencjonowania i mikromacierzy, analiza asocjacyjna całego genomu (GWAS, ang. *genome wide association study*) stała się popularnym narzędziem w badaniach genetycznych. Celem GWAS jest identyfikacja wariantów genetycznych, takich jak polimorfizmy SNP, które są statystycznie powiązane z określonymi cechami fenotypowymi lub chorobami. W metodzie tej, w krótkim czasie można przeanalizować setki tysięcy a nawet milionów polimorfizmów, co znacznie

przyspiesza badania. Technika ta została z powodzeniem wykorzystana w badaniach nad podłożem przepuklin mosznowych świń, gdzie zidentyfikowano warianty genetyczne w obrębie chromosomu 2 i 12. Wśród wskazanych genów znalazły się *ELF5*, *KIF18A*, *COL23A1* i *NPTX1*. Szczególnie interesujący był gen *COL23A1*, kodujący kolagen typu XXIII, gdzie autorzy zaznaczają, że nieprawidłowy metabolizm kolagenu jest uważany za główną przyczynę rozwoju przepuklin (Du i in., 2009). Kolejna analiza skupiająca się na przepuklinach pachwinowych i/lub mosznowych u ras landrace i large white, przyniosła dalsze odkrycia. W pracy z 2015 roku wykorzystano 4842 zwierząt i wykryto 22 SNP dla rasy landrace w zidentyfikowanych regionach QTL na chromosomach 3, 5, 7, 8 i 13 oraz 10 SNP dla świń rasy large white na chromosomach 1, 2, 4, 10 i 13. Ostatecznie, wytypowano geny kandydujące, mające związek z występowaniem przepukliny: *RHOA*, *EGF* i *LEF1* (Sevillano i in., 2015). Sukcesy w wykorzystaniu technologii analizy asocjacyjnej całego genomu przyczyniły się do dalszych badań nad podłożem genetycznym przepuklin. W badaniu nad przepukliną pępkową świń, opublikowanym w 2018 roku, przedstawione zostały wyniki analizy GWAS dla świń rasy landrace. Głównym celem była identyfikacja QTL oraz genów kandydujących. Przeanalizowano dane od 739 świń, wykorzystując panel genotypowania obejmujący 60 tysięcy SNP. Analiza wykazała wysoce istotny region w chromosomie 14, który tłumaczył do 8,6% zmienności fenotypowej. Spośród badanych genów szczególne znaczenie miały geny *LIF* (Leukemia inhibitory factor) oraz *OSM* (Oncostatin M) i warianty w ich obrębie, które były silnie związane z występowaniem przepukliny pępkowej. Podkreślono jednak konieczność przeprowadzenia dalszych badań na innych populacjach w celu ustalenia, czy wykryte warianty są przyczynowe (Grindflek i in., 2018). Kolejna praca wykorzystująca GWAS, opublikowana w 2019 roku, obejmowała genotypowanie 45 świń będących mieszańcami ras erhualian i shaziling. Zidentyfikowano i powiązano z przepukliną pępkową 3 SNP w chromosomach 9, 14 i 16. Autorzy zwrócili uwagę w szczególności na SNP w genie *CAPN9* na chromosomie 14. Gen ten odgrywa rolę w rozwoju przewodu pokarmowego oraz jest ewolucyjnie blisko związany z genami *CAPN1* i *CAPN3*, których kodowane białka pełnią ważne funkcje w apoptozie i regeneracji komórek mięśniowych. Dodatkowym elementem tej analizy było określenie profilu ekspresji genu *CAPN9* u trzech świń rasy yorkshire na różnych etapach rozwoju (3, 90 i 180 dni). Wyniki wskazały, że gen ten charakteryzuje się wysoką ekspresją w przewodzie pokarmowym na wszystkich badanych etapach (Li i in., 2019).

Innym podejściem zastosowanym w badaniach dotyczących przepukliny pępkowej była analiza zmienności liczby kopii (CNV) genów. Technologia ta pozwala na identyfikację delecji lub duplikacji fragmentów genomu, które mogą znacząco wpływać na fenotyp. Przykładem jest publikacja Long i in. (2016), w której analizowano 177 świń z przepukliną pępkową oraz 1124 zwierząt kontrolnych. Zwierzęta pochodziły z trzech ras: duroc, yorkshire i landrace. Spośród 6193 zidentyfikowanych polimorfizmów CNV, osiem zostało powiązane z występowaniem przepukliny pępkowej. Najciekawsze wyniki uzyskano dla genu *NUGGC* w przypadku rasy duroc i dla genu *ABCC4* u świń rasy yorkshire. Hamowanie aktywności genu *ABCC4* wpływa na ograniczenie proliferacji i ruchliwość komórek, co może przyczyniać się do osłabienia ścian brzucha. Natomiast gen *NUGGC* został już wcześniej powiązany z zespołem Beckwitha-Wiedemanna u ludzi, któremu towarzyszy występowanie przepukliny pachwinowej i pępkowej (Long i in., 2016).

Jednym z najnowszych podejść w badaniach nad przepukliną pępkową świń jest poszukiwanie różnic w ekspresji genów, które mogą prowadzić do określonych zmian fenotypowych. Znaczącym przełomem było zastosowanie techniki sekwencjonowania RNA (RNA-seq; ang. *RNA sequencing*) bazującej na sekwencjonowaniu nowej generacji. Jest to narzędzie pozwalające na identyfikację genów różniących się profilem ekspresji pomiędzy grupą badaną a kontrolną (Marguerat i Bähler, 2010). Jedne z pierwszych badań na świniach wykorzystujących tę technikę skupiało się na przepuklinach pachwinowych. Analizowano tkanki pobrane z pierścienia pachwinowego od czterech świń z przepukliną i czterech zdrowych osobników rasy landrace. Autorzy zidentyfikowali 703 geny różniące się ekspresją pomiędzy grupami zwierząt (494 geny o obniżonej ekspresji i 209 genów o podwyższonym poziomie mRNA). Po analizie szlaków metabolicznych wykazano, że geny te były głównie związane z apoptozą, różnicowaniem mięśni gładkich i sygnalizacją wapniową. Zmniejszone różnicowanie mięśni i niska zawartość wapnia mogą osłabiać skurcze mięśni, co predysponuje do rozwoju przepukliny. Ostatecznie wytypowano osiem genów: *BOK*, *TPM2*, *SLC25A4*, *SLC8A3*, *FGF1*, *MYBPC1*, *MAP1CL3C* i *DES*, wskazując, że są to silne geny kandydujące w patogenezie przepukliny (Romano i in., 2020). W kolejnej pracy dotyczącej przepuklin pępkowych świń zespół Souza i in. (2020) analizował fragmenty tkanek pobranych z pierścienia pępowinowego od 10 świń rasy landrace (5 zdrowych i 5 z przepukliną). Analiza RNA-seq wykryła ekspresję 13216 genów, z czego 230 było istotnie różniących

się ekspresją (DEGs; *ang. differentially expressed genes*). W grupie zwierząt z przepukliną, 145 genów wykazało obniżoną ekspresję, a 85 genów podwyższoną. Najbardziej znaczące procesy biologiczne w jakich brały udział zidentyfikowane geny, obejmowały organizację macierzy zewnątrzkomórkowej, metabolizm kolagenu, adhezję komórek, rozwój anatomiczny i procesy immunologiczne. Jako główne geny kandydujące i rodziny genów zostały wskazane: *ACAN*, *CCBE1*, *COLs*, *MMPs*, *EPYC*, *LGALS3* i *VIT*. Badanie przyniosło ciekawe rezultaty, takie jak wskazanie genów biorących udział w metabolizmie kolagenu, co było już wcześniej sugerowane w patogenezie przepuklin oraz genów związanych z integralnością powłok w obrębie brzucha. Jednakże należy mieć na uwadze, że analiza została wykonana na małej stawce zwierząt tylko jednej rasy. Dodatkowo, badane tkanki zawierały zarówno komórki pochodzące z mięśnia jak i tkanki łącznej (Souza i in., 2020). Kolejna praca bazująca na analizie RNA-seq wykorzystwała wcześniej uzyskane dane sekwencjonowania, które były opublikowane w badaniach Souza i in. (2020) oraz Romano i in. (2020). W porównaniu wyników dla przepukliny pępkowej i pachwinowej zidentyfikowano 35 wspólnych DEGs. Geny te uczestniczą w 108 procesach biologicznych, takich jak adhezja komórek, organizacja cytoszkieletu i produkcja kolagenu. Geny *MAP1LC3C*, *ACAN*, *VIT*, *ACER2*, *KCNMA1* oraz *SYNPO2* wskazano jako potencjalnie związane z obydwoma typami przepuklin. Dodatkowo, dzięki analizie skupionej na wykryciu polimorfizmów w danych z sekwencjonowania RNA, autorzy zidentyfikowali 67 SNP w próbkach od świń z przepukliną pachwinową (11 z nich, były to nowo zidentyfikowane SNP) oraz 76 w materiale pochodzącym od świń z przepukliną pępkową (w tym, 14 nowych) Co więcej udało się wskazać potencjalny SNP w genie *ITGAM*, którego obecność prowadzi do zmiany sekwencji aminokwasowej co potencjalnie może wpłynąć na funkcjonowanie kodowanego przez ten gen białka. Należy jednak zaznaczyć, że istotność związku wariantu z rozwojem przepukliny została zidentyfikowana wyłącznie na podstawie analizy bioinformatycznej (Rodrigues i in., 2021). Podsumowanie aktualnej wiedzy dotyczącej genów kandydujących przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Przegląd dotychczas wytypowanych genów kandydujących związanych z występowaniem przepukliny pępkowej świń.

Geny kandydujące	Metoda analizy	Źródło
<i>SRC</i>	GWAS	Liao i in., 2015
<i>NUGGC, ABCC4</i>	GWAS	Long i in., 2016
<i>OSM, LIF</i>	GWAS	Grindflek i in., 2018
<i>CAPN9</i>	GWAS	Li i in., 2019
145 genów o obniżonej ekspresji i 85 o podwyższonej, w tym: <i>ACAN, CCBE1, EPYC, LGALS3, VIT</i> oraz geny z rodziny: <i>COLs, MMPs</i> ,	RNA-seq	Souza i in., 2020
129 genów o obniżonej ekspresji i 70 o podwyższonej, w tym: <i>MAP1LC3C, ACAN, VIT, ACER2, KCNMA1, SYNPO2</i> i <i>ITGAM</i> oraz 76 SNP w obrębie 24 genów	RNA-seq	Rodrigues i in., 2021

4.2.2 Problemy związane z badaniami nad przepukliną pępkową

Przepuklina pępkowa świń stanowi istotne wyzwanie dla hodowców pod względem zmniejszenia strat ekonomicznych i poprawienia jakości życia zwierząt. Aktualne badania wskazują zarówno na środowiskowe, jak i genetyczne czynniki ryzyka, jednak złożona etiologia tej wady pozostaje częściowo niezrozumiana. Istniejące prace badawcze podkreślają wieloczynnikowy charakter powstawania przepukliny, wynikający z interakcji między predyspozycjami genetycznymi a wpływem środowiska. Pomimo stwierdzonego wpływu elementu genetycznego na rozwój przepukliny, szczegółowe określenie genetycznego podłoża tego zjawiska okazuje się trudne. W dużej mierze problem stanowi poligeniczny model dziedziczenia. Pomimo badań stosujących różne techniki jak GWAS, czy RNA-seq, które wskazały obecność istotnych QTL, wariantów

genetycznych i genów istotnie różniących się ekspresją, wciąż brak jednoznacznych wyników wyjaśniających znaczny procent zmienności fenotypowej. Dodatkowym wyzwaniem jest fakt, że różne geny i warianty genetyczne mogą odpowiadać za rozwój przepukliny pępkowej w różnych rasach lub nawet w różnych populacjach tej samej rasy. Może to wynikać z odmiennego podłoża genetycznego oraz odmiennych warunków hodowlanych i środowiskowych, które mogą wpływać na ekspresję genów. Różnice te utrudniają zidentyfikowanie uniwersalnych markerów genetycznych, których użycie pozwoliłoby na selekcję przeciwko wariantom predysponującym do występowania przepukliny w kontekście całego gatunku. Dlatego tak ważne są dalsze badania na różnych rasach i populacjach, uwzględniające zarówno różnorodność genetyczną, jak i zmienne środowiskowe.

5. Hipotezy i cele badań

Hipoteza ogólna:

Przepuklina pępkowa świń jest wynikiem złożonej interakcji czynników genetycznych i epigenetycznych a ryzyko wystąpienia przepukliny może się różnić w zależności od rasy i populacji. W szczególności różnice w funkcjonowaniu tkanki mięśniowej i tkanki łącznej w kontekście ekspresji genów mogą odgrywać kluczową rolę w patogenezie przepukliny.

Ogólny cel badań:

Celem badań jest identyfikacja i charakterystyka czynników genetycznych i epigenetycznych wpływających na ryzyko występowania przepukliny pępkowej świń oraz określenie, w jaki sposób różnice w obrębie tkanki mięśniowej i łącznej wpływają na podatność na tę wadę rozwojową.

W trakcie realizacji badań, aby lepiej odpowiedzieć na postawiony problem badawczy, sformułowano szczegółowe hipotezy i cele odnoszące się do eksperymentów wykonanych w ramach tej pracy doktorskiej:

5.1 Eksperyment 1

Hipoteza badawcza:

W eksperymencie 1 postawiono następującą hipotezę badawczą:

- a) Istnieje związek pomiędzy wcześniej zidentyfikowanymi wariantami DNA w genach *CAPN9*, *OSM*, *ITGAM* oraz *NUGGC*, a występowaniem przepukliny pępkowej w innych rasach i populacjach świń niż miało to miejsce we wcześniejszych badaniach.

Cele badań:

W trakcie badań zrealizowano następujące cele:

- a) Weryfikacja związku między wcześniej zidentyfikowanymi wariantami DNA w genach *CAPN9*, *OSM*, *ITGAM* przy użyciu sekwencjonowania Sangera oraz w genie *NUGGC* przy wykorzystaniu techniki ddPCR, a występowaniem przepukliny pępkowej świń reprezentujących mieszańce o zróżnicowanym udziale rasowym.
- b) Wpływ haplotypów w genach *CAPN9*, *OSM* i *ITGAM* na ryzyko wystąpienia przepukliny pępkowej w zależności od płci zwierząt.

5.2 Eksperyment 2

Hipotezy badawcze:

W eksperymencie 2 postawiono następujące hipotezy badawcze:

- a) Zidentyfikowana wcześniej różnica w poziomie transkryptów genów *ACAN*, *COL6A5*, *MMP13* i *VIT*, pomiędzy świnią z przepukliną pępkową a zdrowymi osobnikami, występuje w przypadku mieszańców o zróżnicowanym udziale rasowym w odniesieniu do tkanki mięśniowej oraz tkanki łącznej.
- b) Metylacja DNA w obrębie regionów regulatorowych genów *ACAN*, *COL6A5*, *MMP13* i *VIT* jest odpowiedzialna za obserwowane różnice w poziomach transkryptów badanych genów.
- c) Obserwowane różnice w poziomie transkryptów genów *ACAN*, *COL6A5*, *MMP13* i *VIT* dla przepukliny pępkowej występują także w przypadku przepukliny pachwinowej świń.

Cele badań:

W trakcie badań zrealizowano następujące cele:

- a) Analiza różnic w poziomie transkryptów genów *ACAN*, *COL6A5*, *MMP13* i *VIT* pomiędzy świniami z przepukliną pępkową a zdrowymi osobnikami w populacjach mieszańców o zróżnicowanym udziale rasowym, w tkance mięśniowej i tkance łącznej.
- b) Analiza wpływu stopnia metylacji DNA w regionach regulatorowych genów *ACAN*, *COL6A5*, *MMP13* i *VIT* na poziomy ich transkryptów.
- c) Określenie poziomu transkryptów genów *ACAN*, *COL6A5*, *MMP13* i *VIT* w tkance mięśniowej świń z przepukliną pachwinową.

5.3 Eksperyment 3

Hipotezy badawcze:

W eksperymencie 3 postawiono następujące hipotezy badawcze:

- a) Przepuklina pępkowa świń może mieć podłoże genetyczne, związane z różnicami w ekspresji genów, w tkance mięśniowej z okolicy pępka.
- b) Czynniki epigenetyczne, takie jak metylacja DNA, regulują ekspresję genów zaangażowanych w rozwój przepukliny
- c) Polimorfizmy w regionach regulatorowych genów przyczyniają się do różnic w ekspresji genów zaangażowanych w rozwój przepukliny świń.

Cele badań:

W trakcie badań zrealizowano następujące cele:

- a) Zidentyfikowanie genów różnicujących się pod względem poziomu ekspresji w tkance mięśniowej z okolicy pępka u świń z przepukliną pępkową oraz u zdrowych osobników.
- b) Analiza poziomu metylacji DNA w regionach regulatorowych genów potencjalnie zaangażowanych w rozwój przepukliny pępkowej i ocena ich wpływu na regulację ekspresji tych genów.
- c) Identyfikacja polimorfizmów w regionach regulatorowych genów, które mogą mieć związek z różnicami w ich ekspresji.

5.3 Eksperyment dodatkowy

Hipoteza badawcza

W eksperymencie dodatkowym postawiono następującą hipotezę badawczą:

- a) Istnieje związek pomiędzy zidentyfikowanymi wcześniej wariantami DNA w genach *MYO19*, *MYH2*, *MYH8*, *ZNF646* i *ZNF713* a występowaniem przepukliny pępkowej w populacjach mieszańców o zróżnicowanym udziale rasowym.

Cele badań:

W trakcie badań zrealizowano następujące cele:

- a) Weryfikacja związku między wcześniej zidentyfikowanymi wariantami DNA w genach *MYO19*, *MYH2*, *MYH8*, *ZNF646* i *ZNF713* przy użyciu sekwencjonowania Sangera a występowaniem przepukliny pępkowej u świń reprezentujących populacje mieszańców o zróżnicowanym udziale ras.

6. Materiał i metody badawcze

Wszelkie metody badawcze wykorzystane podczas przeprowadzania opisanych eksperymentów zostały wykonane według standardowych protokołów stosowanych w Katedrze Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt. Procedury te zostały opisane w poniższym rozdziale.

Próbki tkanek i krwi wykorzystane w eksperymentach zostały pobrane podczas rutynowych procedur weterynaryjnych. Jest to zgodne z obowiązującym prawem w Polsce i nie wymaga zgody Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Poznaniu (13/01/2020).

6.1 Eksperyment 1

6.1.1 Zwierzęta wykorzystane w badaniu, pobrane tkanki oraz izolacja DNA

W badaniu wykorzystano świnie z dwóch komercyjnych ferm hodowlanych (nazywane dalej panelem 1 i panelem 2). Zwierzęta miały około 3–4 miesiące i ważyły 50–70 kg. W obrębie obu paneli świnie zostały podzielone na grupę zwierząt z przepukliną i grupę bez przepukliny, stanowiące kontrolę. Przynależność do poszczególnych grup określił lekarz weterynarii. W dalszych etapach badań oba panele były analizowane niezależnie.

W skład pierwszego panelu wchodziło 412 osobników, w tym 212 osobników z przepukliną pępkową (nazywanych dalej grupą UH od angielskiej nazwy: *umbilical hernia*) i 200 osobników kontrolnych. Świnie były mieszańcami, gdzie ojcowie wywodzili się z rasy landrace lub duroc natomiast matki były krzyżówką ras landrace i yorkshire. Materiał do badań stanowiły próbki krwi pobrane od 362 osobników i fragmenty jąder pochodzące od 50 samców. Łącznie na grupę UH składały się 93 samce i 119 samic, natomiast grupę kontrolną stanowiły 82 samice i 118 samców.

W drugim panelu badane zwierzęta były potomstwem matek będących krzyżówką ras large white i duroc oraz ojców stanowiących mieszańce ras large white i pietrain. Materiał

do badań stanowiły fragmenty ucha pobrane od 171 osobników. Łącznie panel obejmował 86 świń z przepukliną (43 samce i 43 samice) i 85 zwierząt kontrolnych (47 samic i 38 samców).

DNA z próbek krwi zostało wyizolowane przy użyciu zestawu Blood Mini kit (A&A Biotechnology), natomiast z tkanek przy wykorzystaniu zestawu Genomic Mini (A&A Biotechnology). Ocena jakościowa i ilościowa została dokonana za pomocą spektrofotometru NanoDrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific).

6.1.2 Analiza sekwencjonowania metodą Sangera

W celu przeprowadzenia sekwencjonowania Sangera namnożono fragmenty DNA wskazane w literaturze (Tabela 2) Startery PCR zaprojektowano przy użyciu oprogramowania Primer3Plus bazując na sekwencji genomu świni: Sscrofa11.1 (Table S1 – artykuł 1). Reakcje PCR przeprowadzono w termocyklerze Biometra (Biometra). Temperatura przyłączanie starterów wynosiła: 61°C dla *OSM*, 57°C dla *CAPN9* i 60°C dla *ITGAM*. W celu oceny specyficzności reakcji, długości amplikonów sprawdzono na 1,5% żelu agarozowym za pomocą elektroforezy.

Tabela 2. Charakterystyka badanych fragmentów genów: *CAPN9*, *OSM* i *ITGAM*.

Gen	Pozycja badanego fragmentu DNA	Wariant	Artykuł oryginalny
Calpain-9 (<i>CAPN9</i>)	chr14:59603379- 59604090 ekson 10	rs321865883 Ref:A>Alt:G p.416Leu>Leu	Li i in., 2019
Oncostatin M (<i>OSM</i>)	chr14:47243686- 47244307 ekson 3	brak wskazanego wariantu	Grindflek i in., 2018
Integrin α M (<i>ITGAM</i>)	chr3:17254038- 17254595 ekson 2	rs327289001 Ref:C>Alt:T p.150Val>Met	Rodrigues i in., 2021

Ref-allel referencyjny; Alt-allel alternatywny

Po zakończeniu reakcji PCR, produkty zostały oczyszczone za pomocą fosfatazy alkalicznej i egzonukleazy (Thermo Fisher Scientific). Następnie została przeprowadzona reakcja sekwencjonowania z wykorzystaniem BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Life Technologies). Produkt końcowy przed elektroforezą został oczyszczony poprzez zastosowanie płytek filtracyjnych wypełnionych złożem Sephadex G50 (Sigma). Elektroforezę kapilarną przeprowadzono na sekwenatorze Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems) lub Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems).

Ostatni etap obejmował analizę wyników za pomocą oprogramowania SeqMan z pakietu DNASTAR (DNASTAR) gdzie wyniki analizowano w porównaniu do genomu referencyjnego (Sscrofa11.1). Chromatogramy oceniano w celu identyfikacji potencjalnych różnic nukleotydowych, a uzyskane wyniki posłużyły do określenia częstotliwość występowania zaobserwowanych wariantów.

6.1.3 Analiza występowania CNV

W celu określenia zmienności liczby kopii w obrębie genu *NUGGC* wykorzystano technikę ddPCR. Zastosowano gen referencyjny - czynnika krzepnięcia II (*F2*), a w celu lepszej dystrybucji DNA do kropli użyto enzymu restrykcyjnego *EcoRI*. Pierwszym etapem analizy było przygotowanie mieszaniny reakcyjnej (zestaw dla genu *NUGGC* z sondą znakowaną FAM, DNA, ddPCR Supermix, enzym *EcoRI*, startery, sondę dla genu referencyjnego *F2* znakowaną HEX oraz wodę) i podzielenie jej na około 20 000 kropli przy użyciu generatora QX200 (Bio-Rad). W celu amplifikacji fragmentu obejmującego region z chromosomu 14:11811750–14:11811889 wykorzystano termocykler Gradient T100 Thermal Cycler (Bio-Rad). Temperatura przyłączania starterów wynosiła 58°C. Po zakończeniu reakcji PCR, liczba kopii badanego fragmentu została wykryta przy użyciu QX200 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad). Wyniki analizowano przy wykorzystaniu oprogramowania QuantaSoft (Bio-Rad) wykorzystując rozkład Poissona do precyzyjnego określenia liczby kopii.

6.1.4 Analiza statystyczna

Częstość alleli dla SNP w genach *CAPN9*, *OSM* i *ITGAM* określono porównując grupę UH i kontrolną przy użyciu testu ilorazu szans z wykorzystaniem platformy online MedCalc Software (https://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php). Dalsze analizy zostały przeprowadzone w środowisku R (wersja 4.1.0) przy wykorzystaniu pakietów „SNPassoc” (wersja 2.0-2) oraz „haplo.stat” (wersja 1.8.7). Otrzymaną wartość p skorygowano metodą Benjamini-Hochberg. Wykonano także analizę frekwencji haplotypów. Ocenę związku haplotypu z występowaniem przepukliny oraz interakcji haplotypu i płci przeprowadzono z wykorzystaniem regresji logistycznej. W każdej przeprowadzonej analizie wartość $p < 0,05$ została przyjęta jako próg istotności statystycznej.

Wyniki CNV otrzymane dzięki technice ddPCR analizowano przy wykorzystaniu testu ilorazu szans przy użyciu platformy online MedCalc Software (https://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php).

6.2 Eksperyment 2

6.2.1 Zwierzęta wykorzystane w badaniu, pobrane tkanki oraz izolacja DNA i RNA

W badaniu analizowano świnie z przepukliną pępkową oraz zdrowe osobniki pochodzące z jednej fermy. Drugą grupę stanowiły zwierzęta z przepukliną pachwinową i odpowiednio osobniki kontrolne. Obie grupy zwierząt z każdej fermy były analizowane niezależnie.

Analizowano 34 świnie z przepukliną pępkową i 34 osobniki kontrolne pochodzące z tej samej komercyjnej fermy hodowlanej zlokalizowanej w województwie wielkopolskim. Matki tych zwierząt były mieszańcami ras landrace i yorkshire natomiast ojcowie pochodzili z ras landrace lub duroc. Świnie zostały zakwalifikowane do poszczególnych grup przez lekarza weterynarii tak aby każde zwierzę z przepukliną było spokrewnione z przynajmniej jednym z grupy kontrolnej. Jako materiał badawczy zostały pobrane fragmenty tkanki mięśniowej i tkanki łącznej z okolic pępka.

Niezależne analizy wykonano także dla świń z przepukliną pachwinową i zdrowych osobników. Były to niespokrewnione samce, krzyżówki polskiej białej zwisłouchiej i polskiej rasy złotnickiej. Na podstawie opinii lekarza weterynarii zwierzęta podzielono na cztery grupy: grupę zdrowych młodych zwierząt o masie 30–35 kg (10 osobników); grupę 15 świń o masie 30–35 kg z przepukliną pachwinową; grupę 11 osobników o masie 30–35 kg początkowo z przepukliną, która uległa zanikowi; oraz grupę 10 dorosłych zwierząt o masie 100–120 kg z przepukliną pachwinową. Jako materiał do badań został pobrany fragment tkanki mięśniowej z okolicy kanału pachwinowego.

Całkowite RNA do analizy poziomu ekspresji zostało wyizolowane z pobranych tkanek przy wykorzystaniu zestawu RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen). Ocena ilościowa i jakościowa została wykonana za pomocą spektrofotometru NanoDrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific). Próbkę wyizolowanego RNA została następnie poddana odwrotnej transkrypcji przy użyciu zestawu Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche).

DNA do analizy poziomu metylacji zostało wyizolowane z tkanki mięśniowej za pomocą zestawu Genomic Mini Kit (A&A Biotechnology).

6.2.2 Analiza poziomu mRNA

Analizowano poziom transkryptów dla genów *ACAN*, *COL6A5*, *MMP13* i *VIT* przy użyciu techniki PCR w czasie rzeczywistym. Badanie wykonano dla tkanki mięśniowej i tkanki łącznej pobranej od 34 zdrowych zwierząt i 34 zwierząt z przepukliną pępkową oraz dla fragmentu tkanki kanału pachwinowego pobranego łącznie od 46 zwierząt. Analizy zostały wykonane niezależnie dla każdej tkanki. Startery zostały zaprojektowane za pomocą oprogramowania Primer3Plus (Table S1 – artykuł 2). Do analizy użyto zestawu LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche), gdzie każda próbka analizowana była w dwóch powtórzeniach technicznych. Dla wszystkich starterów temperatura przyłączania wynosiła 60°C.

Względny poziom ekspresji genów został oszacowany przy użyciu metody krzywej standardowej, wykorzystując serię dziesięciokrotnych rozcieńczeń DNA o znanej koncentracji (standardy). Aby określić zmiany w poziomie ekspresji, dane zostały

znormalizowane w odniesieniu do genów referencyjnych *H3F3A* i *PPIA* zgodnie z procedurą opisaną przez Vandesompele i in. (2002).

6.2.3 Analiza poziomu metylacji DNA

Do analizy poziomu metylacji wybrano geny *MMP13* i *VIT*, które w analizie PCR w czasie rzeczywistym wykazały statystycznie istotne różnice w poziomie ekspresji między grupą kontrolną a badaną. Pierwszy etap obejmował analizę *in silico* w celu określenia występowania wysp CpG. Przy użyciu oprogramowania CpGPlot zlokalizowano obszar w regionie nieulegającym translacji 5' pierwszego eksonu genu *MMP13* oraz w eksonie 12 genu *VIT*. Startery zostały zaprojektowane przy użyciu programowania PyroMark Assay Design 2.0 (Qiagen) (Table S2 – artykuł 2). W badaniu przeanalizowano DNA z tkanki mięśniowej od 34 zwierząt z przepukliną pępkową oraz 34 osobników kontrolnych. DNA poddano konwersji wodorosiarczanem sodu za pomocą zestawu EZ DNA Methylation-Gold (Zymo Research). Wykonano także kontrolę niemetylowaną przy wykorzystaniu REPLI-g Mini Kits (Qiagen), zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta. Kontrola metylowana została natomiast otrzymana przy użyciu metylotransferazy CpG (M.SssI, Thermo Fisher Scientific) poprzez inkubację przez 3 godziny w temperaturze 37°C. Reakcja PCR została przeprowadzona za pomocą zestawu PyroMark PCR Kit (Qiagen), gdzie temperatura przyłączania starterów wynosiła 56°C. Produkty PCR sprawdzano za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym i przeprowadzono reakcję pirosekwencjonowania zestawem PyroMark Q48 Advanced CpG Reagents (Qiagen) z użyciem pirosekwencjatora PyroMark Q48 Autoprep (Qiagen) w celu otrzymania procentowego poziomu metylacji.

6.2.4 Analiza statystyczna

Całość analiz statystycznych została przeprowadzona w środowisku statystycznym R (wersja 4.1.2). Do porównania wyników z PCR w czasie rzeczywistym dla tkanki łącznej i mięśniowej wykorzystano test U Manna-Whitneya używając funkcji „wilcox.test” z pakietu „stats” (wersja 4.1.2). W teście porównano wyniki pochodzące od 34 zwierząt z przepukliną pępkową i 34 kontroli dla każdego analizowanego genu

osobno. Wyniki zostały poddane korekcji za pomocą poprawki Benjamini-Hochberg z wykorzystaniem funkcji „p.adjust” z pakietu „stats” (wersja 4.1.2).

W porównaniach poziomu metylacji w obrębie badanego fragmentu również użyto testu U Manna-Whitneya, przy użyciu funkcji „wilcox.test”, gdzie każda badana cytozyna była analizowana niezależnie.

Ostatnim etapem było zastosowanie testu korelacji rang Spearmana, funkcją „cor.test” z pakietu „stats” (wersja 4.1.2) w celu zbadania istotności korelacji pomiędzy względnym poziomem mRNA a poziomem metylacji CpG dla genu *MMP13*.

W przypadku przepukliny pachwinowej porównano cztery grupy używając testu Kruskala-Wallisa (funkcja „kruskal.test” z pakietu „stats”: wersja 4.1.2) oraz testu Dunna (funkcja „dunnTest” z pakietu „FSA”: wersja 0.9.3) do wielokrotnych porównań z korekcją współczynnika fałszywych odkryć (FDR; *ang. false discovery rate*), jako testu post hoc.

W każdej przeprowadzonej analizie wartość $p < 0,05$ została przyjęta jako próg istotności statystycznej.

6.3 Eksperyment 3

6.3.1 Zwierzęta wykorzystane w badaniu, pobrane tkanki oraz izolacja DNA, RNA i białka

W badaniu wykorzystano łącznie próbki od sześćdziesięciu ośmiu prosiąt, które przy udziale lekarza weterynarii zostały zakwalifikowane do dwóch grup: 34 zwierzęta z przepukliną pępkową stanowiły grupę badaną, a 34 zdrowe osobniki stanowiły grupę kontrolną. Zwierzęta, w wieku 3–4 tygodni pochodziły z krzyżówki ojcowskich linii landrace lub duroc z matkami będącymi mieszańcami landrace i yorkshire. Świnie zostały przyporządkowane do grup tak aby każde zwierzę z przepukliną miało przynajmniej jednego osobnika, stanowiącego jego rodzeństwo w grupie kontrolnej. Próbkę tkanki mięśniowej pobrano z okolic pępka zarówno od zwierząt zdrowych, jak i dotkniętych przepukliną. RNA zostało wyizolowane przy pomocy zestawu RNeasy Fibrous Tissue

Mini Kit (Qiagen). Czystość izolatów została zweryfikowana na spektrofotometrze NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Dodatkowo dla procedury sekwencjonowania RNA, koncentrację zmierzono także przy wykorzystaniu fluorometru Qubit 2.0 (Invitrogen) i zestawu Qubit RNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Dodatkowo, dla oceny jakości RNA oszacowano wskaźnik integralności RNA (RIN; ang. *RNA Integrity Number*) przy użyciu RNA 6000 Nano Kit na urządzeniu Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). W przypadku DNA, do izolacji wykorzystano zestaw Genomic Mini Kit (A&A Biotechnology). Analiza ilościowa została przeprowadzona przy wykorzystaniu spektrofotometru NanoDrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific). Białka wyizolowano z tkanki mięśniowej przy wykorzystaniu buforu do lizy RIPA (Sigma-Aldrich). Zestaw do oznaczania białek Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) oraz fluorometr Qubit (Invitrogen) zostały użyte w celu oznaczania ilości wyizolowanych białek.

6.3.2 Analiza sekwencjonowania RNA

Do sekwencjonowania RNA-seq przygotowano próby od 15 osobników z przepukliną i od 15 zwierząt zdrowych. Do analizy zostały wybrane próby o RIN powyżej 8 i ze stosunkiem absorbancji przy długości fali 260/280 nm powyżej 2,0. Do konstrukcji bibliotek wykorzystano 100 ng całkowitego RNA na próbkę wykorzystując zestaw TruSeq Stranded mRNA Kit (Illumina). Sam proces sekwencjonowania został przeprowadzony przez zewnętrzne laboratorium komercyjne na platformie Illumina NovaSeq 6000, generując dwukierunkowe odczyty o długości 2×100 pz.

6.3.3 Analiza bioinformatyczna wyników z RNA-seq

Jakość otrzymanych odczytów została oceniona przy użyciu narzędzia FastQC. Przycięcie odczytów o niskiej jakości i usunięcie sekwencji adapterowych zostało wykonane dzięki zastosowaniu narzędzia BBDuk2 z pakietu BBmap. Mapowanie wykonano do referencyjnego genomu świni z bazy Ensembl (Sscrofa11.1) używając narzędzia STAR. Odczyty zostały zliczone przy zastosowaniu Rsubread a normalizacja

wykonana przy pomocy edgeR. Ostatecznie analiza różnicowa ekspresji genów została wykonana przy użyciu pakietu limma (model liniowy). Podstawową zmienną grupującą w modelu była obecność lub brak przepukliny, uwzględniono również pokrewieństwo i płeć. Geny istotnie różniące się ekspresją zostały określone na podstawie skorygowanej wartości p przy wykorzystaniu FDR gdzie wartość $p < 0,05$ uznano za wynik istotny statystycznie. Dodatkowo przeprowadzona została analiza wzbogacenia terminów ontologii genów (GO; *ang. gene ontology*) za pomocą pakietu systemPipeR. Wartości p została skorygowana metodą Bonferroniego $< 0,05$. Analiza polimorfizmów została przeprowadzona przy użyciu narzędzi BWA, GATK i Samtools. Zidentyfikowane warianty zostały opisane i przypisane do odpowiednich funkcji za pomocą pakietów VariantAnnotation i snpStats. Analiza statystyczna różnic w występowaniu polimorfizmów pomiędzy grupami została wykonana za pomocą testu Fishera, z korekcją FDR.

6.3.4 Weryfikacja wyników z RNA-seq metodą PCR w czasie rzeczywistym

W celu weryfikacji wyników wykonano analizę PCR w czasie rzeczywistym. W badaniu rozszerzono liczebności zwierząt w grupach: 34 osobniki z przepukliną i 34 kontrolne. cDNA zostało otrzymane dzięki odwrotnej transkrypcji przy użyciu zestawu Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche). Na potrzeby tej analizy wybrano 11 genów bazując na ich funkcji, skorygowanej wartości p i wyniku $\log_2FC$ (odzwierciedlającym różnicę w poziomach mRNA). Uwzględniono również, czy wybrane geny uczestniczą w określonych szlakach biologicznych istotnych dla prawidłowego funkcjonowania tkanki mięśniowej, które były istotne w analizie GO wybrane geny to: *ALX1*, *ALX4*, *EYA2*, *HOXA7*, *IRX5*, *METTL21C*, *OSR2*, *PITX1*, *PVALB*, *SIMI* i *TBX1*. Oprogramowanie Primer3Plus zostało użyte do zaprojektowania starterów (Tabela 3). Do analizy wykorzystano zestaw LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche), gdzie każda próbka analizowana była w trzech powtórzeniach technicznych. Temperatura przyłączania wynosiła 60°C dla wszystkich zaprojektowanych starterów. Względne poziomy mRNA badanych genów określono metodą krzywej standardowej, wykorzystując serię dziesięciokrotnych rozcieńczeń próbki DNA o znanym stężeniu (standardy). W celu normalizacji względnej zmiany w poziomie ekspresji genów,

otrzymane wartości porównano z genami referencyjnymi *H3F3A* i *PPIA*, stosując metodę normalizacji opisaną przez Vandesompele i in. (2002).

Tabela 3. Startery użyte w PCR w czasie rzeczywistym.

Gen	Sekwencja starteru 5' → 3'	Długość amplikonu (pz)	Temp. przyłączania (°C)
<i>ALX1</i>	F: CTGGAGGAGCTGGAGAAGGT	220	60
	R: TGTCAGTCCTGGGCAAACT		
<i>ALX4</i>	F: CACCCGAGCAGAGAACTACG	173	56
	R: CCCAGAGACACTCAGGAAG		
<i>EYA2</i>	F: GTGTGTTTCGTGTGGGACTTG	148	60
	R: GTGTCTGCGAGGCTGAAGAT		
<i>HOXA7</i>	F: AGGCCAATTTCCGCATTTAT	124	58
	R: AGGTAGCGGTTGAAGTGGAA		
<i>IRX5</i>	F: GCTACAACTCGCACCTCCAG	124	60
	R: GGGTGGTACCCCAAGGAG		
<i>METTL21C</i>	F: AGGAACATGCGGAGGAACTG	312	60
	R: TGAGCAGCTTGTCCAGGAAG		
<i>OSR2</i>	F: CCATCTCGGGCCTCAGTAAA	319	60
	R: TGCATATGTAAAGTTTTGTGAACTGC		
<i>PITX1</i>	F: GAGGAGATCGCTGTGTGGAC	170	60
	R: GCGTACACATCCTCGTAGGG		
<i>PVALB</i>	F: TGGTTGGCCTGAAGAAAAAG	165	60
	R: CCATCAGCGTCTTGGTTTCT		
<i>SIMI</i>	F: ATTGAGCGCTCCTTCTTCT	128	60
	R: ATGTCCAGGCTGTACTGTCTG		
<i>TBX1</i>	F: CCATGCACAGATACCAGCCA	201	60
	R: GATCGCAATCTCGGAAGCCT		

6.3.5 Analiza metylacji DNA z wykorzystaniem pirosekwencjonowania

Analiza została wykonana w celu identyfikacji zmian w poziomie metylacji DNA dla ośmiu genów wykazujących istotne różnice w analizie PCR w czasie rzeczywistym. Wybrane do badania geny to: *ALX1*, *EYA2*, *HOXA7*, *METTL21C*, *PITX1*, *PVALB*, *SIMI* i *TBX1*. Miejsca bogate w CpG zostały wybrane bazując na danych z NCBI Gene oraz oprogramowaniu CpGPlot. Analiza *in silico* wykazała obecność CpG w niekodujących, 5'-flankujących regionach genów *ALX1*, *EYA2*, *HOXA7*, *METTL21C*, *PITX1* i *SIMI*, w

regionie 5' nieulegającym translacji (5'UTR, ang. *untranslated region*) pierwszego eksonu genu *TBX1* oraz w regionie pierwszego eksonu genu *PVALB*. Dla wybranych regionów zaprojektowano startery za pomocą oprogramowania PyroMark Assay Design 2.0 (Qiagen) – Tabela 4. W analizie badano DNA wyizolowane od 34 osobników z przepukliną i 34 zdrowych świń. Konwersja wodorosiarczanem sodu została wykonana za pomocą EZ DNA Methylation-Gold (Zymo Research). Dodatkowo kontrolę metylowaną przygotowano poprzez inkubację DNA z metylotransferazą CpG (M.SssI, Thermo Fisher Scientific) przez trzy godziny w temperaturze 37°C. Niemetylowaną kontrolę uzyskano, przy wykorzystaniu zestawu REPLI g Mini Kit (Qiagen), zgodnie z protokołem producenta. W kolejnym etapie przeprowadzono reakcję PCR za pomocą zestawu PyroMark PCR (Qiagen) z temperaturą przyłączania starterów w 56°C i oceniono produkty przy użyciu elektroforezy w żelu agarozowym. Pirosekwencjonowanie wykonano w pirosekwencjonatorze PyroMark Q48 Autoprep (Qiagen) z użyciem odczynników PyroMark Q48 Advanced CpG Reagents (Qiagen) w celu otrzymania danych o procencie metylacji każdej z badanych cytozyn.

Tabela 4. Startery użyte w pirosekwencjonowaniu.

Gen	Sekwencja starteru 5' → 3'	Długość amplikonu (pz)	Temp. przyłączania (°C)
<i>ALX1</i>	F:GGAGAGTGGAGGGTTAATTG	183	56
	R:5'biot-CCCCCATCTTCCCCTCTT		
	S:GTGGAGGGTTAATTGT		
<i>EYA2</i>	F:5'TTGGTGTTGTAGATGTTTTATAGATG	234	56
	R:5'biot-ACTCTCTACCCCTACAACCCA		
	S:5'TAGAGGGAGGAGGTG		
<i>HOXA7</i>	F:5'GGATTTGAGTTTTAAGTTGGTTAATG	165	56
	R:5'biot-TCCCTACCCTTCTTTCTACCA		
	S:5'GGTTAATGGTTTATTGGAT		
<i>METTL21C</i>	F:5'biot-TGTTAGTATTAGGGTTTAGGGTAGAGTT	264	56
	R:5'ACACACACACCCCATCT		
	S:5'ATACAACTAACACACTATAT		
<i>PITX1</i>	F:5'GAGGGGTTTGTAGGTTAGAT	79	56
	R:5'biot-TCACCCTCCTTCCCC		
	S:5'GGGTTTGTAGGTTAGAT		
<i>PVALB</i>	F:5'AGAATGGGAGTAGGGTTAAGG	225	56
	R:5'biot-AAACCCCAAAAAAAAAACACCTCAAATTT		
	S:5'GGGGTTTTGTATTTTATTAGG		
<i>SIMI</i>	F:5'TTGGGATTAATTTAAAATAATTTTTTGG	201	56

<i>TBX1</i>	R:5'biot-ACAAAAAAAAACAAAAATAAACCAAAC	181	56
	S:5'AAAGAGGAAATATAATTTAATA		
	F:5'TGGATGGGAAGGTTATGGA		
	R:5'biot-ACTTACTACCCACCATAACAAC		
	S:5'GGAGGTTTTAGGGGTA		

5'biot: starter znakowany cząsteczką biotyny na końcu 5'; S: starter sekwencyjny

6.3.6 Analiza sekwencji regionów 5'-flankujących metodą Sanger

W badaniu przeanalizowano fragmenty regionów 5'-flankujących genów, które wykazały istotne różnice w analizie PCR w czasie rzeczywistym: *ALX1*, *EYA2*, *HOXA7*, *METTL21C*, *PITX1*, *PVALB*, *SIMI* i *TBX1*. DNA do sekwencjonowania pochodziło od 34 prosiąt dotkniętych przepukliną i 34 kontroli. Startery zaprojektowano przy użyciu oprogramowania Primer3Plus bazując na sekwencji genomu świni *Sscrofa11.1* (Tabela 5). Po wykonaniu PCR i sprawdzenia produktów w żelu agarozowym, amplikony poddano oczyszczeniu za pomocą fosfatazy alkalicznej i egzonukleazy przeprowadzając inkubację w 37°C przez 30 minut i kolejno w 80°C przez 15 minut. Sekwencjonowanie przeprowadzono używając zestawu BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Thermo Fisher Scientific) według protokołu: inkubacja w 95°C przez 20 sekund, kolejno 25 cykli składających się z 3 etapów (95°C przez 12 sekund, 51°C przez 8 sekund i 60°C przez 4 minuty). W następnym etapie produkty zostały oczyszczone poprzez zastosowanie płytek filtracyjnych wypełnionych złożem Sephadex G50 (Sigma). Elektroforezę kapilarną wykonano w Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems). Program SeqMan z pakietu DNASTAR (DNASTAR) posłużył do analizy wyników, gdzie otrzymane chromatogramy analizowano w porównaniu do sekwencji referencyjnej: *Sscrofa11.1*.

Tabela 5. Startery użyte w sekwencjonowaniu regionów 5'-flankujących metodą Sanger.

Gen	Sekwencja starteru 5' → 3'	Długość amplikonu (pz)	Temp. przyłączania (°C)
<i>ALX1</i>	F: ACGAGCCTCCCTTTGGTCTA	790	60
	R: TTGAAACTCAGCTGGGCTCC		
<i>EYA2</i>	F: CATGTGGAGGGGCGTGTAC	516	63
	R: CCCACACCTCCTCCCTCTAT		
<i>HOXA7</i>	F: TAGAGGGCGGGTAAACAGTG	761	60
	R: GCTAAAAAGCGCGTTCACAT		
<i>METTL21C</i>	F: GCTCACTGGGTAAGCATGGT	700	64
	R: TACCCACCAGTAGCCAGACA		
<i>PITX1</i>	F: CAAGCTAATTAGGAGGCAGCA	693	65
	R: GCCTGTCTTAAAGCGACAGC		
<i>PVALB</i>	F: CAGATGTGGGATGGGGCAC	260	64
	R: GCGCATCTCCTAGGATGTCC		
<i>SIM1</i>	F: CTGGCCTATTCCTGCCTCTC	774	62
	R: TCCGCTTCACCTACCTTCAG		
<i>TBX1</i>	F: AGGCACTTTCCGCTGGAG	600	60
	R: GGCCAGGACGCTTATACATC		

6.3.7 Analiza wariantów DNA zidentyfikowanych w RNA-seq metodą Sanger

W badaniu przeanalizowano polimorfizmy wybrane na podstawie analizy wariantów z danych RNA-seq. Wykazano trzy SNP prowadzące do zmiany aminokwasu: rs341151132 (C>T) w genie *GALNT16* skutkujący zamianą Arg>Trp, rs690269483 (A>G) w *PAOX* (zmiana His>Arg) i rs334837422 (C>T) w *RFTN1* (zmieniający Ala>Thr), oraz rs318378401 (A>G) w regionie 3'UTR, w genie *SLC9A1*. Do sekwencjonowania posłużyło DNA pochodzące od 34 zdrowych osobników i 34 świń z przepukliną pępkową. Procedura sekwencjonowania i analiza wyników została wykonana identycznie jak opisano w przypadku analizy regionów 5'-flankujących (pkt. 6.3.6), a użyte startery przedstawia Tabela 6.

Tabela 6. Startery użyte w analizie wariantów DNA zidentyfikowanych w RNA-seq.

Gen	Sekwencja starteru 5'→ 3'	Długość amplikonu (pz)	Temp. przyłączania (°C)
<i>GALNT16</i>	F:ACCTGTCTCATTCTGAATGAAGGA	380	60
	R:TGGCTTCTCTGTTTCTAGGGC		
<i>PAOX</i>	F:AGCCGTCATCACAACACAGT	543	60
	R:CTTCTTGAACCAGGCGTCCT		
<i>RFTN1</i>	F:CCCTCACAGATCCAGGAAGC	532	60
	R:ACACGTGACCTTTTGGAGCA		
<i>SLC9A1</i>	F:GCGTCTGTCCTTCACCCTAG	217	60
	R:TCTTTTGTACAGGCGGCAGA		

6.3.8 Analiza liczby kopii wybranych genów metodą ddPCR

DNA pochodzące od 34 prosiąt z przepukliną pępkową i 34 zwierząt kontrolnych poddano analizie w poszukiwaniu polimorfizmów liczby kopii obejmujących wytypowane geny techniką ddPCR. Analizie poddano geny: *ALX1*, *EYA2*, *HOXA7*, *METTL21C*, *PITX1*, *PVALB*, *SIMI* i *TBX1*, które wykazały istotne różnice w analizie PCR w czasie rzeczywistym. Wszystkie procedury przeprowadzono zgodnie z instrukcjami producenta. Jako gen referencyjny wybrano gen *F2*. Sekwencje użytych starterów i sond przedstawia Tabela 7. W celu przygotowania mieszaniny do reakcji PCR, połączono ze sobą zestaw z sondą dla genu badanego, znakowaną FAM, ddPCR Supermix, enzymem restrykcyjnym *EcoRI*, sondę dla genu referencyjnego *F2* (znakowaną HEX), startery, DNA i wodę. W celu podziału mieszaniny PCR na około 20 000 kropli wykorzystano urządzenie QX200 (Bio-Rad). PCR został wykonany na termocyklerze Gradient T100 Thermal Cycler (Bio-Rad) z temperaturą przyłączania starterów: 58°C. Do wykrycia kopii DNA został wykorzystany czytnik QX200 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad).

Tabela 7. Startery użyte w analizie ddPCR.

Gen	Sekwencja starteru 5' → 3'	Długość amplikonu (pz)	Temp. przyłączania (°C)
<i>ALX1</i>	F: 5' CTCAAGAGCCCACCGAGTAA	108	58
	R: 5' CGACGCTTTGCTGTAAAAGGA		
	S: 5' FAM- GGAGGCGCGTTAGAGCACGT -BQH1		
<i>EYA2</i>	F: 5' AGGAAATGCTAGAACTAGTGATCTCA	120	58
	R: 5' GCCTACCTTCGATGTCACTCAG		
	S: 5' FAM- CTGTAAACAGCGACCGTCCCGG -BQH1		
<i>HOXA7</i>	F: 5' GAGCCGACTTCTTGCTCCTT	112	58
	R: 5' AGAGGGGGCTGTTGACATTG		
	S: 5' FAM-GCCTTCCCTTCGACCGTGCC-BQH1		
<i>METTL21C</i>	F: 5' TGGCCAGCTCTCTCCTCC	119	58
	R: 5' CTTGTCCCCCTCTGCCCT		
	S: 5' FAM- CAGCAGCCCCAGCACCTGG-BQH1		
<i>PITX1</i>	F: 5' CATGAGTCTGGAGCGGCTG	80	58
	R: 5' CTAGGTGGAAGGCGGGCC		
	S: 5' FAM- CGCCGCCGCACGACATGG-BQH1		
<i>PVALB</i>	F: 5' GGACATCCTAGGAGATGCGC	86	58
	R: 5' GAGTTCTCCTGCCGTCAAGG		
	S: 5' FAM- GGCCCTGCACCTCATCAGGC-BQH1		
<i>SIM1</i>	F: 5' TGGTTTTGGATGAATCTGTGGA	94	58
	R: 5' CCTAGTCCGGGCAGCATTTT		
	S: 5' FAM- CGCCGCCGCACGACATGG-BQH1		
<i>TBX1</i>	F: 5' CTCCGACCTGGTGAAGCTTC	80	58
	R: 5' CTTCCATGTCCCTGGTGACG		
	S: 5' FAM- CCGGCCGGGATGCACTTCAG-BQH1		
<i>F2</i>	F: 5' CTGCCAGCGGGCTGGGAATA 3'	97	58
	R: 5' GGAGTTGACTCTGGAATAAGAAATTG 3'		
	5' HEX-CGCCCCCGCCCCAGGGTCT-BQH1 3'		

5' FAM: barwnik fluorescencyjny przyłączony na końcu 5' (ang. *Fluorescein amidite*);
 HEX: barwnik fluorescencyjny przyłączony na końcu 5' (ang. *Hexachlorofluorescein*); S:
 sonda; BQH1: cząsteczka tłumiąca fluorescencję (wygaszacz)

6.3.9 Analiza poziomu białka metodą western-blot

Technika western blot została wykorzystana do analizy poziomu białka dla 12 zwierząt z przepukliną i 12 osobników zdrowych. W analizie badano białka, których geny wykazały istotne różnice w analizie PCR w czasie rzeczywistym. Z powodu problemów ze specyficznością przeciwciał dla świń, tylko białka: SIM1 (Abcam; I-rzędowe przeciwciało kozie ab126863), PITX1 (Abcam: I-rzędowe przeciwciało królicze

ab70273), EYA2 (Thermo Fisher Scientific; I-rzędowe przeciwciało królicze PA5-68561) i TBX1 (Abcam: I-rzędowe przeciwciało królicze ab109313) zostały użyte w badaniu. Jako białko referencyjne użyto GAPDH (Abcam: I-rzędowe przeciwciało mysie ab8245).

Próbki przygotowano poprzez zmieszanie 25 µg całkowitej puli białek dla SIM1, PITX1, EYA2 oraz 30 µg dla TBX1 z buforem Bolt LDS Sample Buffer (Thermo Fisher Scientific) i środkiem redukującym Bolt Sample Reducing Agent (Thermo Fisher Scientific). Denaturacja prowadzona była w 70°C przez 10 minut. Elektroforezę wykonano z wykorzystaniem żelu Bolt 12% Bis-Tris Plus (Thermo Fisher Scientific). Każda próbka była nanoszona na żel w dwóch powtórzeniach tak by jedno powtórzenie testować z przeciwciałem dla badanego białka a drugie dla białka referencyjnego. Membrany (Life Technologies) blokowano w 5% odtłuszczonego mleku i płukano buforem TBST. Inkubacja z przeciwciałem pierwszorzędowym odbywała się w 4°C przez noc, a inkubacja z drugorzędowym (Abcam: II-rzędowe przeciwciało kozie anti-królicze ab97051, Abcam: II-rzędowe przeciwciało królicze anti-mysie ab6728, Abcam: II-rzędowe przeciwciało królicze anti-kozie ab6741) sprzężonym z peroksydazą chrzanową w temperaturze pokojowej przez dwie godziny. Detekcję z wykorzystaniem substratu Immobilon Forte Western HRP (Merck) wykonano w systemie ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad). Intensywności prążków analizowano za pomocą oprogramowania ImageLab (Bio-Rad).

6.3.10 Analiza statystyczna

Poziomy transkryptów uzyskane na podstawie analizy PCR w czasie rzeczywistym porównano między grupą kontrolną i badaną za pomocą dwustronnego testu U Manna-Whitneya oraz testu post-hoc Dunna z korektą Benjamini-Hochberga w oprogramowaniu R (wersja 2023), korzystając z pakietu „stats” (wersja oprogramowania R: 2023). Współczynnik korelacji rang Spearmana dla wyników PCR w czasie rzeczywistym i RNA-seq obliczono w oprogramowaniu R z wykorzystaniem pakietu „stats” (wersja oprogramowania R: 2023). Dla wyników z pirosekwencjonowania dwustronny test U Manna-Whitneya z korektą FDR został wykorzystany do porównano poziomu metylacji CpG między grupą badaną a kontrolną, korzystając z pakietu „stats” (wersja oprogramowania R: 2023) w środowisku R (wersja 2023). Współczynnik korelacji rang Spearmana dla wyników metylacji DNA i PCR w czasie rzeczywistym obliczono w

oprogramowaniu R z wykorzystaniem pakietu „stats” (wersja oprogramowania R: 2023). Analizę przeprowadzono wyłącznie dla miejsc CpG, które wykazały istotne różnice w poziomie metylacji.

Platforma	online	MedCalc	Software
(https://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php)			została wykorzystana do porównania
liczby alleli między grupą badaną a kontrolną za pomocą testu ilorazu szans w analizie			sekwencji regionów regulatorowych. Dodatkowo oprogramowanie online ALGGEN-
PROMO	w	wersji	8,3
(https://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB			= TF_8.3)
zostało wykorzystane do określenia miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych w			
analizowanym fragmencie sekwencji genu <i>METTL21C</i> . Ponadto, w celu potwierdzenia,			
że badana sekwencja 5' flankująca stanowi region promotora, wykorzystano narzędzie			
Neural Network Promoter Prediction (https://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html).			
Analizę przeprowadzono z zastosowaniem progu punktowego 0,8.			

W przypadku analizy wariantów DNA uzyskanych metodą sekwencjonowania Sangera (zidentyfikowanych w RNA-seq), do porównania liczby alleli w obu grupach wykorzystano test ilorazu szans korzystając z platformy online MedCalc Software (https://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php). Liczba kopii analizowanych genów techniką ddPCR została obliczona przy użyciu oprogramowania QuantaSoft (wersja 1.7.4.0917, Bio-Rad). Program wykorzystywał rozkład Poissona, przyjmując dwie kopie genu referencyjnego (*F2*) jako standard. Dla otrzymanych wyników z analizy poziomu białka, wykorzystano test U Manna-Whitneya dla prób niezależnych w programie R (wersja 2023) przy użyciu pakietu „stats” (wersja oprogramowania R: 2023).

6.4 Eksperyment dodatkowy

6.4.1 Opis zwierząt, pobranych tkanek oraz izolacja DNA

Próbki wykorzystane w badaniu pochodziły od świń, które miały około 3–4 miesiące i ważyły 50–70 kg. Zwierzęta te pochodziły z dwóch komercyjnych ferm hodowlanych położonych w Wielkopolsce i zostały podzielone na dwie grupy: panel 1 i panel 2. Oba panele były analizowane niezależnie. Szczegółowa charakterystyka paneli

została przedstawiona w pkt. 6.1.1. W przypadku genu *MYO19* analiza została przeprowadzona na 412 osobnikach z panelu 1 (212 UH i 200 kontroli) oraz na 171 zwierzętach z panelu 2 (86 UH i 85 kontroli). W przypadku pozostałych genów (*MYH2*, *MYH8*, *ZNF646*, *ZNF713*) w badaniu wykorzystano 52 świnie z panelu 1 (26 UH i 26 kontrole) i 52 z panelu 2 (26 UH i 26 kontrole).

W badaniu analizowano DNA, które zostało wyizolowane z krwi przy wykorzystaniu zestawu Blood Mini kit (A&A Biotechnology), natomiast z tkanek przy użyciu zestawu Genomic Mini (A&A Biotechnology). W celu przeprowadzenia oceny jakościowej i ilościowej wykonano pomiar spektrofotometryczny izolatów przy użyciu NanoDrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific).

6.4.2 Analiza sekwencjonowania z wykorzystaniem techniki Sanger

Pierwszym etapem analizy było zaprojektowanie starterów przy wykorzystaniu oprogramowania Primer3Plus bazując na sekwencji genomu świnie: Sscrofa11.1 (Tabela 8). Startery zostały zaprojektowane w celu analizy wariantów SNP wskazanych w publikacji Savoldi i in., 2021 (Tabela 9).

Tabela 8. Startery użyte w analizie wariantów SNP wskazanych w publikacji Savoldi i in., 2021.

Gen	Sekwencja starteru 5'→3'	Długość amplikonu (pz)	Temp. przyłączania (°C)
<i>MYO19</i>	F: CTGTTTCCTAAGTCTGCCTCTCC	427	61
	R: GTCAGGGTAGCACCTCATGG		
<i>MYH2</i>	F: ACCAGGTTGACCATCCATGT	576	63
	R: CCCACACCTCCTCCCTCTAT		
<i>MYH8</i>	F: TCAACCTTGGCCAGTGTCAG	543	63
	R: AAGCAATCTGCCCCAAGGTCA		
<i>ZNF646</i>	F: CAGATCCACCTCAGCCTCCA	324	63
	R: CCCTCCTTTTCCTGCAGCC		
<i>ZNF713</i>	F: CAGGGGGAGATTTTCGAGCA	294	61
	R: TCTGAACCCAGAGTCCCCAA		
<i>ZNF713</i>	F: TGTGCTGTTGAGTAAGTGAAGGA	543	72
	R: AGCCCTTCAGCCAAAACCTCA		

Tabela 9. Charakterystyka badanych fragmentów genów: *MYO19*, *MYH2*, *MYH8*, *ZNF646* i *ZNF713*.

Gen	Pozycja genomowa badanego fragmentu DNA	Badany SNP
<i>MYO19</i>	12:38025736-38026162	rs335136145 G>A
<i>MYH2</i>	12:55266824-55267399	nowy wariant (12:55267170) G>C
<i>MYH8</i>	12:55146743-55147285	nowy wariant (12:55146905) A>C
<i>ZNF646</i>	3:17399344-17399667	rs337670844 C>T
<i>ZNF713</i>	3:16963944-16964237	rs323115420 T>A
	3:16960765-16961307	rs337918521 C>A

W reakcji PCR temperatury przyłączanie starterów wynosiły: 61°C dla *MYO19* oraz dla wariantu rs323115420 w genie *ZNF713*; 63°C dla *MYH2*, *MYH8*, *ZNF646* i wariantu rs337918521 w genie *ZNF713*. Przy użyciu elektroforezy w żelu agarozowym oceniono specyficzność reakcji.

Kolejnym etapem było wykorzystanie fosfatazy alkalicznej i egzonukleazy (Thermo Fisher Scientific) w celu oczyszczenia produktów PCR inkubując próby w 37°C przez 30 minut i kolejno w 80°C przez 15 minut. Reakcja sekwencjonowania została wykonana z wykorzystaniem BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Life Technologies), według protokołu: inkubacja w 95°C przez 20 sekund, następnie 25 cykli składających się z 3 etapów (95°C przez 12 sekund, 51°C przez 8 sekund i 60°C przez 4 minuty). Produkt końcowy został przefiltrowany z użyciem złoża Sephadex G50 (Sigma) a sekwenator Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems) lub Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems) został wykorzystany do przeprowadzenia elektroforezy kapilarnej.

Otrzymane wyniki zostały przeanalizowane za pomocą oprogramowania SeqMan z pakietu DNASTAR (DNASTAR). Jako genom referencyjny wykorzystano Sscrofa11.1.

6.4.3 Analiza statystyczna

Analiza statystyczna została wykonana dla obu paneli niezależnie. W każdym panelu, dla każdego genu niezależnie porównywano wyniki pomiędzy grupą kontrolną a badaną. Stosując test ilorazu szans. Analizę przeprowadzono z wykorzystaniem platformy online MedCalc Software (https://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php). Otrzymane wartości p zostały skorygowane metodą Benjamini-Hochberg w środowisku R (wersja 4.2.2), przy użyciu pakietu „stats” (wersja 4.2.2) i funkcji „p.adjust”.

7. Wyniki

7.1 Eksperyment 1

Wyniki zawarte w artykule nr 1:

Wozniak, J., Loba, W., Iskrzak, P., Pszczola, M., Wojtczak, J., Switonski, M., & Nowacka-Woszek, J. (2023). A confirmed association between DNA variants in *CAPN9*, *OSM*, and *ITGAM* candidate genes and the risk of umbilical hernia in pigs. *Animal Genetics*, 54(3), 307–314. <https://doi.org/10.1111/age.13307>

7.1.1 Związek wariantów DNA w genach *CAPN9*, *OSM* i *ITGAM* z występowaniem przepukliny pępkowej świń

Sekwencjonowanie Sangera ujawniło 10 SNP w *CAPN9*, 5 SNP w *OSM* i 2 SNP w *ITGAM*. Związek polimorfizmów z występowaniem przepukliny został przedstawiony jako iloraz szans. Porównanie częstości występowania alleli między grupą kontrolną a badaną wykazało istotne różnice dla 4 SNP (rs340675701, rs336325720, rs333405922, rs344753123) w genie *CAPN9*, wyłącznie dla zwierząt z panelu 1 (Table 1 – artykuł 1). Dodatkowo wykazano, że większość badanych SNP spełniała założenie równowagi Hardy’ego-Weinberga, z wyjątkiem 4 SNP (rs327407895, rs321865883, rs341372952, rs327289001) w panelu 1 oraz jednego (rs341372952) w panelu 2.

7.1.2 Analiza haplotypów

Przeprowadzona analiza haplotypów wykazała, że w przypadku genu *OSM*, haplotyp CAGGA wiązał się z obniżeniem ryzyka wystąpienia UH o 52% w porównaniu z najczęstszym haplotypem TCAAG. Wartość prawdopodobieństwa wynosiła 0,0147. Podobnie, w genie *ITGAM* haplotyp AT zmniejszał ryzyko wystąpienia przepukliny pępkowej o 45% względem haplotypu AC ($p = 0,0234$). Oba wyniki zostały otrzymane wyłącznie dla zwierząt z panelu 2 (Table 2 – artykuł 1).

Dodatkowo w celu zbadania efektu haplotypów i interakcji z płcią przeprowadzono analizę regresji logistycznej. Stwierdzono istotną interakcję pomiędzy haplotypem CTCGCCCTTG w genie *CAPN9* a płcią ($p = 0,0421$), w przypadku panelu drugiego (Table 2 – artykuł 1). Otrzymane wyniki sugerują, że zidentyfikowane układy haplotypów związane są z występowaniem przepukliny w badanej populacji. Ryzyko UH może być modulowane przez specyficzne haplotypy w połączeniu z płcią osobnika. Wyniki te podkreślają potencjalną rolę wpływu profilu hormonalnego w kształtowaniu ryzyka tej wady rozwojowej.

7.1.3 Analiza liczby kopii genu *NUGGC*

W przypadku genu *NUGGC* w celu zbadania różnic w liczbie kopii fragmentu tego genu, przeprowadzono analizę przy użyciu ddPCR. W badaniu zidentyfikowano jeden przypadek zwierzęcia z przepukliną pępkową, który posiadał trzy kopie analizowanego fragmentu genu (Figure 1 – artykuł 1). Jednakże różnice w liczbie kopii pomiędzy grupami badanymi a kontrolnymi nie były istotne statystycznie dla obu paneli. Wyniki te nie potwierdzają wcześniejszych badań przeprowadzonych w innej populacji świń o związku zmiennej liczby kopii tego genu z występowaniem przepukliny (Long i in., 2016).

7.1.4 Znaczenie wyników

Otrzymane wyniki potwierdzają związek zidentyfikowanych wariantów genetycznych w genach *CAPN9*, *OSM* i *ITGAM* z ryzykiem występowania UH, jednocześnie podkreślając znaczenie poszczególnych haplotypów w modulacji tego ryzyka. Haplotypy CAGGA (gen *OSM*) i AT (gen *ITGAM*) zostały zidentyfikowane jako potencjalne markery zmniejszające podatność na wystąpienie przepukliny, co może mieć znaczenie praktyczne w hodowli świń.

W przypadku genu *NUGGC* nie potwierdzono istotności różnic w zakresie jego liczby kopii. Obserwacja ta może być wynikiem wykorzystania innych grup zwierząt,

różniących się profilem genetycznym co może sugerować inną genezę przepukliny w zależności od badanej rasy czy populacji.

Przeprowadzone analizy i uzyskane wyniki wykazały złożony charakter badanej wady, gdzie bezpośrednie przyczyny mogą różnić się pomiędzy różnymi rasami i populacjami świń. Zrozumienie interakcji między haplotypami a płcią może dostarczyć nowych wskazówek do dalszych badań nad mechanizmami molekularnymi leżącymi u podstaw tej wady.

Graficzne podsumowanie niniejszych wyników przedstawia Rycina 3



Rycina 3. Graficzne podsumowanie wyników eksperymentu 1.

7.2 Eksperyment 2

Wyniki zawarte w artykule nr 2:

Wozniak, J., Loba, W., Wysocka, A., Dzimira, S., Prządka, P., Switonski, M., & Nowacka-Woszuk, J. (2023). Altered transcript levels of *MMP13* and *VIT* genes in the muscle and connective tissue of pigs with umbilical hernia. *Genes*, 14(10), 1903. <https://doi.org/10.3390/genes14101903>

7.2.1 Istotne różnice w poziomach transkryptów genów *MMP13* i *VIT*, u zwierząt z przepukliną pępkową

W celu zbadania różnic w poziomach transkryptów genów *MMP13*, *VIT*, *ACAN* i *COL6A5* przeprowadzono PCR w czasie rzeczywistym dla 34 świń z UH i 34 zdrowych osobników. Badanie zostało przeprowadzone niezależnie dla tkanki mięśniowej i tkanki łącznej. Analiza wykazała, że poziom transkryptu genu *MMP13* był istotnie wyższy w tkance mięśniowej świń z UH w porównaniu do grupy kontrolnej, gdzie skorygowana wartość prawdopodobieństwa była mniejsza niż 0,01 (Fig. 1A – artykuł 2). W przypadku tkanki łącznej poziom ten był znacząco niższy (padj. < 0,001 – Fig. 1B - artykuł 2). Dla genu *VIT* w tkance mięśniowej również zaobserwowano podwyższony poziom mRNA (padj. < 0,05 – Fig. 1A - artykuł 2), jednak w tkance łącznej nie stwierdzono istotnych różnic dla tego genu. Poziomy transkryptów genów *ACAN* i *COL6A5* nie wykazywały istotnych zmian w żadnej z analizowanych tkanek (Fig. 1A, Fig. 1B – artykuł 2).

7.2.2 Analiza poziomu metylacji DNA

W poszukiwaniu przyczyn odpowiedzialnych za obserwowane istotne różnice w poziomie transkryptów przeprowadzono pirosekwencjonowanie fragmentów wybranych genów w celu określenia poziomu metylacji poszczególnych cytozyn. Takie różnice mogłyby wyjaśniać obserwowane zmiany poziomu mRNA pomiędzy badanymi grupami. Dla genu *MMP13* zaobserwowano wyższy poziom metylacji w jednej z analizowanych cytozyn u świń z UH w porównaniu do grupy kontrolnej (średnio 34% vs. 29%; $p < 0,001$ – Fig. 3A - artykuł 2). Jednak nie wykazano istotnej korelacji między poziomem metylacji a poziomem transkryptu genu, co sugeruje, że różnice w metylacji nie są główną przyczyną zmian w poziomie mRNA tego genu. W przypadku genu *VIT*, żadna z badanych cytozyn nie wykazała statystycznie istotnej różnicy w poziomie metylacji.

7.2.3 Zidentyfikowane różnice w poziomie transkryptów genów u zwierząt z przepukliną pachwinową

Poziom transkryptów genów *MMP13*, *VIT*, *ACAN* i *COL6A5* został oznaczony w czterech grupach zwierząt. Jedynie w przypadku genu *ACAN* odnotowano istotne różnice ($p < 0,05$ – Fig. 2 - artykuł 2). Poziom mRNA był istotnie niższy w grupie dorosłych świń z przepukliną (waga: 100–120 kg) w porównaniu do trzech grup młodszych osobników o wadze 30–35 kg. Na podstawie otrzymanych wyników wysunięto wniosek, że obniżony poziom transkryptu genu *ACAN* jest efektem wieku, a nie patologii związanej z występowaniem przepukliny pachwinowej.

7.2.4 Znaczenie wyników

Badania wykazały różnice w poziomach transkryptów genów *MMP13* i *VIT* dla zwierząt z przepukliną pępkową, zależne od rodzaju tkanki. Na podstawie otrzymanych wyników wysnuto wniosek, że obniżenie ekspresji genu *MMP13* w tkance łącznej może być jedną z przyczyn rozwoju przepukliny pępkowej w badanej rasie świń. Natomiast podwyższony poziom transkryptu w tkance mięśniowej wynikać może z obecności przepukliny i wzmożonego zachodzenia procesów naprawczych w tej tkance wywołanych stanem patologicznym.

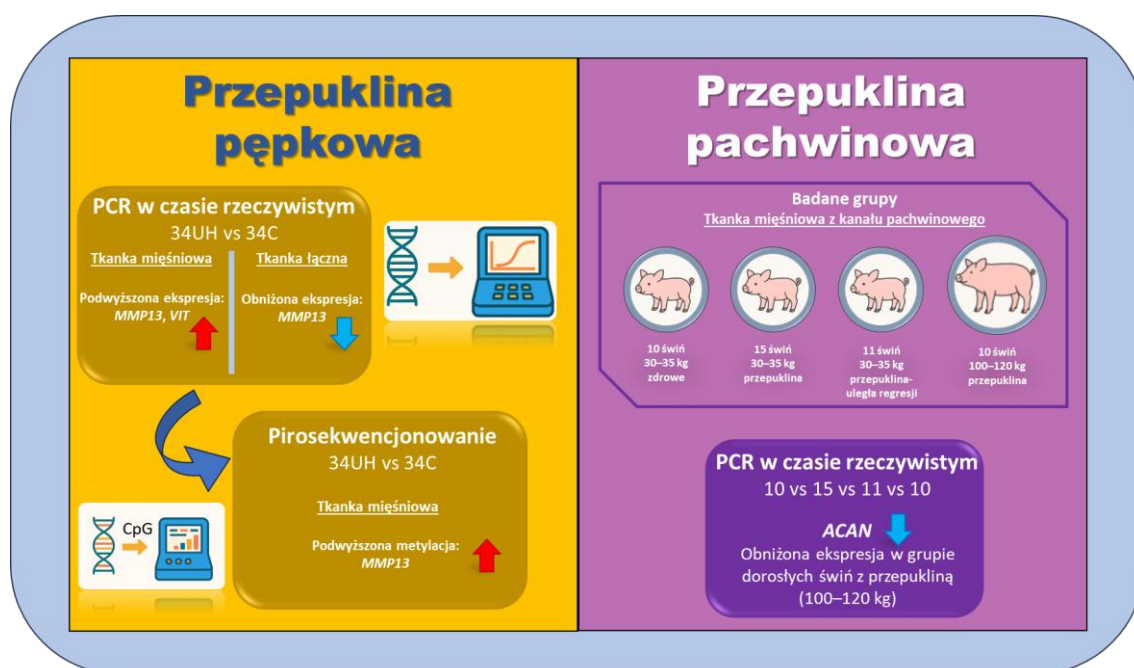
W przypadku genu *VIT* jego podwyższona ekspresja w tkance mięśniowej również może być wynikiem procesów regeneracyjnych. Nie jest to zgodne z wcześniejszą obserwacją innych badaczy (Souza i in., 2020), gdzie sugerowano związek obniżonej ekspresji genu *VIT* z przepukliną. Jednakże we wcześniejszym badaniu nie stosowano analiz dla poszczególnych typów tkanek lecz badano mieszaninę wielu typów komórek/tkanek obecnych we fragmencie pierścienia pępkowego. W niniejszej pracy po raz pierwszy przedstawiono, że poziom transkryptu może się różnić w zależności od tkanki pobranej z miejsca wystąpienia przepukliny (tj. z okolicy pępka) świń.

W przypadku przepukliny pachwinowej jedynie gen *ACAN* wykazał istotne różnice w ekspresji, co jednak najprawdopodobniej wiąże się z wiekiem zwierząt. Białko agrekan, kodowane przez gen *ACAN* jest kluczowym składnikiem macierzy zewnątrzkomórkowej

chrząstki, występującym w formie agregatów. Odgrywa ważną rolę w funkcjonowaniu tkanek chrzęstnych i w procesie kostnienia (Roughley i Mort, 2014). Obserwowane różnice mogą wynikać z zapotrzebowania na wyższy poziom tego białka u młodych świń w fazie intensywnego wzrostu, podczas gdy u dorosłych jego rola koncentruje się na rozwoju szkieletu. Ponadto, białko to wchodzi w skład macierzy zewnątrzkomórkowej chrząstki, której ilość zmniejsza się wraz z wiekiem (Miranda-Duarte, 2018).

Różnice w metylacji DNA nie wydają się mieć decydującego wpływu na zmiany poziomu mRNA w przypadku analizowanych genów. Jednak obecność istotnie zmetylowanej cytozyny w genie *MMP13* wskazuje potencjalne pole do przyszłych badań.

Graficzne podsumowanie niniejszych wyników przedstawia Rycina 4.



Rycina 4. Graficzne podsumowanie wyników eksperymentu 2.

7.3 Eksperyment 3

Wyniki zawarte w wysłanym do redakcji artykule nr 3:

Wozniak, J., Szabelska-Beresewicz, A., Zyprych-Walczak, J., Niemyjski, R., Dudek, K., Stachowiak, M., & Nowacka-Woszek J. (2025 – złożona do *BMC Genomics*). Genetic and epigenetic markers in the *METTL21C* gene associated with umbilical hernia in pigs

7.3.1 Analiza różnicowa transkryptomów

W analizie RNA-seq oszacowano poziom mRNA dla 14919 genów, z czego 234 geny wykazały statystycznie istotne różnice pomiędzy badanymi grupami ($p < 0,05$). Po zastosowaniu dodatkowego kryterium $FDR < 0,05$ oraz $|\log_2FC| > 1$, wytypowano ostatecznie 59 genów (określonych jako geny o zróżnicowanej ekspresji – DEGs, *ang. differently expressed genes*). Wśród nich 31 genów wykazywało podwyższoną ekspresję (Tabela 10), a 28 obniżony (Tabela 11) poziom mRNA u zwierząt z przepukliną w porównaniu do grupy kontrolnej. Wykres w postaci tzw. heatmapy dla 59 genów uszeregowanych pod względem rosnącej wartości FDR przedstawiono na Rycinie 5.

Tabela 10. Zestawienie 31 genów wykazujących podwyższoną ekspresję w RNA-seq z $FDR < 0,05$ i $\log_2FC > 1$.

Geny	Log ₂ FC	Skorygowana wartość p	Symbol
ENSSSCG00000004357	3,75	$1,8 \times 10^{-4}$	<i>SIMI</i>
ENSSSCG00000016701	2,26	$1,8 \times 10^{-4}$	<i>HOXA7</i>
ENSSSCG00000032145	2,19	$2,7 \times 10^{-4}$	<i>IRX5</i>
ENSSSCG00000016705	1,31	$3,9 \times 10^{-4}$	<i>HOXA3</i>
ENSSSCG00000033532	2,62	$3,0 \times 10^{-3}$	<i>SBK2</i>
ENSSSCG00000044237	1,17	$3,0 \times 10^{-3}$	LncRNA
ENSSSCG00000036741	3,11	$4,7 \times 10^{-3}$	<i>PITXI</i>
ENSSSCG00000047270	1,59	$6,0 \times 10^{-3}$	LncRNA
ENSSSCG00000031101	3,63	$6,0 \times 10^{-3}$	<i>METTL21C</i>
ENSSSCG00000037140	1,43	$6,1 \times 10^{-3}$	ENSSSCG00000037140
ENSSSCG00000016704	1,92	$8,8 \times 10^{-3}$	<i>HOXA4</i>

ENSSSCG00000007555	3,45	$1,0 \times 10^{-2}$	<i>UNCX</i>
ENSSSCG00000032838	1,03	$1,2 \times 10^{-2}$	<i>MYOZ2</i>
ENSSSCG00000004218	1,11	$1,2 \times 10^{-2}$	<i>RSPO3</i>
ENSSSCG000000041276	1,04	$1,2 \times 10^{-2}$	LncRNA
ENSSSCG00000004250	1,01	$1,2 \times 10^{-2}$	<i>SLC35F1</i>
ENSSSCG00000028997	2,17	$1,3 \times 10^{-2}$	<i>HOXA9</i>
ENSSSCG00000034997	2,50	$1,5 \times 10^{-2}$	ENSSSCG00000034997
ENSSSCG00000042355	1,47	$1,6 \times 10^{-2}$	ENSSSCG00000042355
ENSSSCG00000011324	1,19	$1,7 \times 10^{-2}$	ENSSSCG00000011324
ENSSSCG00000048585	1,37	$1,7 \times 10^{-2}$	LncRNA
ENSSSCG00000039756	1,29	$1,7 \times 10^{-2}$	<i>FOXC1</i>
ENSSSCG00000033979	1,04	$2,0 \times 10^{-2}$	<i>KLHL34</i>
ENSSSCG00000033348	2,43	$2,1 \times 10^{-2}$	<i>ISL2</i>
ENSSSCG00000029715	1,17	$2,1 \times 10^{-2}$	<i>OLFM1</i>
ENSSSCG00000035073	1,07	$2,1 \times 10^{-2}$	ENSSSCG00000035073
ENSSSCG00000040173	3,77	$2,5 \times 10^{-2}$	<i>DLGAP3</i>
ENSSSCG00000048737	2,50	$2,7 \times 10^{-2}$	LncRNA
ENSSSCG00000007857	1,20	$2,9 \times 10^{-2}$	<i>ACSM3</i>
ENSSSCG00000021204	3,15	$3,2 \times 10^{-2}$	<i>HOXA10</i>
ENSSSCG00000044180	1,00	$4,7 \times 10^{-2}$	LncRNA

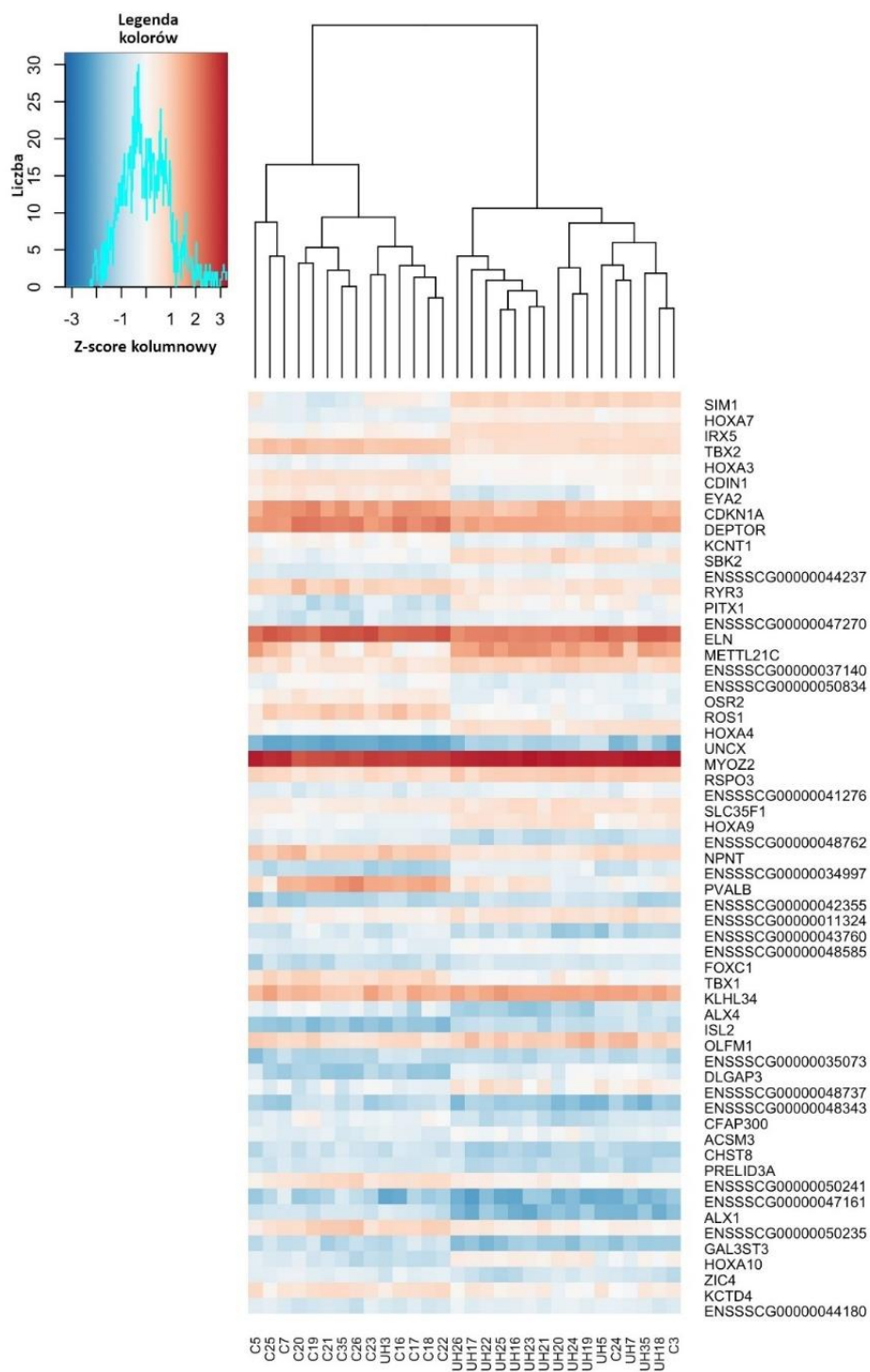
Log₂FC: logarytm z krotności zmiany; LncRNA: długie niekodujące RNA

Tabela 11. Zestawienie 28 genów wykazujących obniżoną ekspresję w RNA-seq z FDR < 0,05 i log₂FC < -1.

Geny	Log ₂ FC	Skorygowana wartość p	Symbol
ENSSSCG00000027060	-1,18	$3,7 \times 10^{-4}$	<i>TBX2</i>
ENSSSCG00000007453	-2,28	$4,2 \times 10^{-4}$	<i>EYA2</i>
ENSSSCG00000026900	-1,27	$4,2 \times 10^{-4}$	<i>CDIN1</i>
ENSSSCG00000001565	-1,31	$1,3 \times 10^{-3}$	<i>CDKN1A</i>
ENSSSCG00000049630	-1,20	$2,3 \times 10^{-3}$	<i>DEPTOR</i>
ENSSSCG00000005762	-1,26	$2,8 \times 10^{-3}$	<i>KCNT1</i>
ENSSSCG00000033958	-1,18	$4,6 \times 10^{-3}$	<i>RYS3</i>
ENSSSCG00000025858	-1,04	$6,1 \times 10^{-3}$	<i>ELN</i>
ENSSSCG00000050834	-1,03	$6,1 \times 10^{-3}$	ENSSSCG00000050834
ENSSSCG00000006073	-1,44	$8,1 \times 10^{-3}$	<i>OSR2</i>
ENSSSCG00000026978	-2,89	$8,1 \times 10^{-3}$	<i>ROS1</i>
ENSSSCG00000048762	-1,25	$1,3 \times 10^{-2}$	NA
ENSSSCG00000038801	-1,10	$1,4 \times 10^{-2}$	<i>NPNT</i>
ENSSSCG00000000138	-3,71	$1,6 \times 10^{-2}$	<i>PVALB</i>

ENSSSCG00000043760	-1,92	$1,7 \times 10^{-2}$	LncRNA
ENSSSCG00000037762	-1,78	$1,9 \times 10^{-2}$	<i>TBX1</i>
ENSSSCG00000040329	-2,34	$2,1 \times 10^{-2}$	<i>ALX4</i>
ENSSSCG00000048343	-1,89	$2,7 \times 10^{-2}$	Pseudogene
ENSSSCG00000014980	-1,77	$2,8 \times 10^{-2}$	<i>CFAP300</i>
ENSSSCG00000047161	-2,60	$2,9 \times 10^{-2}$	LncRNA
ENSSSCG00000050241	-1,08	$2,9 \times 10^{-2}$	LncRNA
ENSSSCG00000036781	-1,03	$2,9 \times 10^{-2}$	<i>PRELID3A</i>
ENSSSCG00000035222	-1,02	$2,9 \times 10^{-2}$	<i>CHST8</i>
ENSSSCG00000036744	-2,89	$2,9 \times 10^{-2}$	<i>ALX1</i>
ENSSSCG00000050235	-1,32	$3,0 \times 10^{-2}$	LncRNA
ENSSSCG00000028015	-1,71	$3,1 \times 10^{-2}$	<i>GAL3ST3</i>
ENSSSCG00000011693	-1,06	$4,0 \times 10^{-2}$	<i>ZIC4</i>
ENSSSCG00000022868	-1,14	$4,3 \times 10^{-2}$	<i>KCTD4</i>

Log₂FC: logarytm z krotności zmiany; LncRNA: długie niekodujące RNA



Rycina 5. Heatmapa dla 59 genów z $FDR < 0,05$ oraz $|\log_2FC| > 1$.

7.3.2 Analiza wzbogacenia funkcjonalnego szlaków biologicznych

Analiza szlaków dla 59 genów różniących się ekspresją (DEGs) ujawniła, że geny te były zaangażowane w 60 istotnych procesów biologicznych oraz zidentyfikowano 16 różnych funkcji molekularnych (na podstawie bazy Gene Ontology). Warto podkreślić, że te procesy obejmują kluczowe funkcje biologiczne i szlaki, takie jak rozwój i morfogeneza układu szkieletowego (GO:0001501, GO:0048704 i GO:0048705) obejmująca takie geny jak: *ALX1*, *HOXA9*, *HOXA7*, *HOXA4*, *HOXA3*, *IRX5*, *OSR2* i *ALX4*. Proces rozwoju narządów zarodkowych (GO:0048568 i GO:0048562) był związany z szerszym zestawem genów, w tym: *ALX1*, *TBX2*, *HOXA9*, *HOXA7*, *HOXA4*, *HOXA3*, *IRX5*, *OSR2*, *FOXC1*, *RSPO3* i *ALX4*. Podobnie, rozwój zarodkowy strunowców (GO:0043009) obejmował kluczowe geny takie jak: *ALX1*, *TBX2*, *HOXA9*, *HOXA7*, *HOXA4*, *HOXA3*, *IRX5*, *OSR2*, *CDKN1A*, *FOXC1*, *RSPO3* i *ALX4*. Inna wzbogacona ścieżka – morfogeneza zarodkowa (GO:0048598 i GO:0009790) – obejmowała te same geny, z dodatkowym genem *HOXA10*, lecz bez *CDKN1A* (Tabela 12).

Tabela 12. Zestawienie zidentyfikowanych ścieżek dla 59 genów różniących się ekspresją.

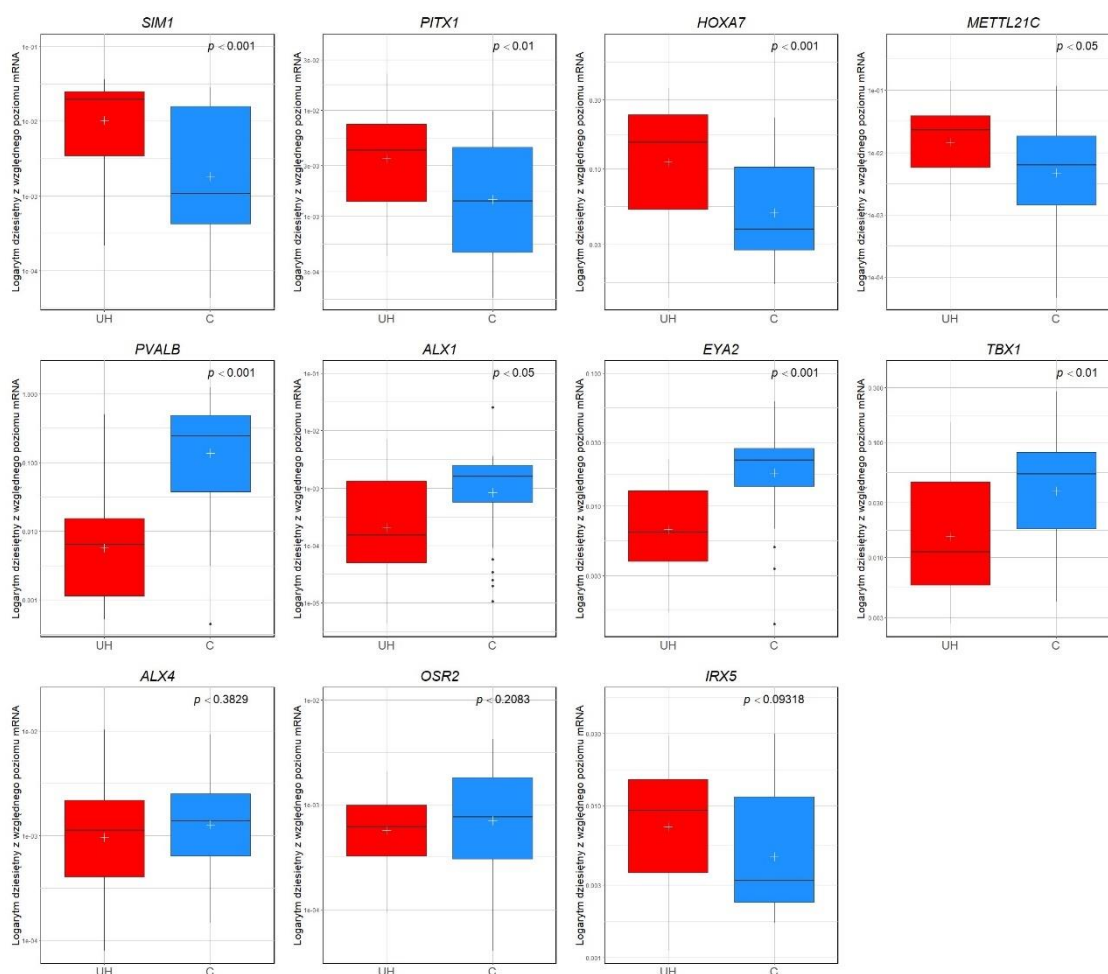
Identyfikator ścieżki	Nazwa ścieżki (nazwa oryginalna w j. angielskim)	Skorygowana wartość p	Liczba DEGs w ścieżce
GO:0048704	embryonic skeletal system morphogenesis	$1,08 \times 10^{-10}$	8
GO:0048706	embryonic skeletal system development	$1,06 \times 10^{-9}$	8
GO:0048568	embryonic organ development	$1,76 \times 10^{-9}$	11
GO:0048598	embryonic morphogenesis	$2,19 \times 10^{-9}$	12
GO:0048705	skeletal system morphogenesis	$2,77 \times 10^{-9}$	9
GO:0043009	chordate embryonic development	$1,12 \times 10^{-8}$	12
GO:0009792	embryo development ending in birth or egg hatching	$1,29 \times 10^{-8}$	12
GO:0048562	embryonic organ morphogenesis	$2,73 \times 10^{-8}$	9
GO:0003700	DNA-binding transcription factor activity	$7,58 \times 10^{-8}$	14
GO:0001501	skeletal system development	$1,03 \times 10^{-7}$	10
GO:0009790	embryo development	$1,63 \times 10^{-7}$	13
GO:0000981	DNA-binding transcription factor activity, RNA polymerase II-specific	$1,99 \times 10^{-7}$	13
GO:1990837	sequence-specific double-stranded DNA binding	$2,92 \times 10^{-7}$	14
GO:0000977	RNA polymerase II transcription regulatory region sequence-specific DNA binding	$3,26 \times 10^{-7}$	13

GO:0003690	double-stranded DNA binding	$5,61 \times 10^{-7}$	14
GO:0009887	animal organ morphogenesis	$6,11 \times 10^{-7}$	12
GO:0000976	transcription cis-regulatory region binding	$9,74 \times 10^{-7}$	13
GO:0001067	transcription regulatory region nucleic acid binding	$9,85 \times 10^{-7}$	13
GO:0043565	sequence-specific DNA binding	$1,03 \times 10^{-6}$	14
GO:0009952	anterior/posterior pattern specification	$2,28 \times 10^{-6}$	7
GO:0140110	transcription regulator activity	$3,21 \times 10^{-6}$	14
GO:0003002	regionalization	$8,49 \times 10^{-6}$	8
GO:0007389	pattern specification process	$1,56 \times 10^{-5}$	8
GO:0003677	DNA binding	$2,25 \times 10^{-5}$	15
GO:0048513	animal organ development	$2,26 \times 10^{-5}$	16
GO:0009653	anatomical structure morphogenesis	$4,05 \times 10^{-5}$	15
GO:0045944	positive regulation of transcription by RNA polymerase II	$5,62 \times 10^{-5}$	11
GO:0009888	tissue development	$6,31 \times 10^{-5}$	13
GO:0030326	embryonic limb morphogenesis	$8,21 \times 10^{-5}$	5
GO:0035113	embryonic appendage morphogenesis	$8,21 \times 10^{-5}$	5
GO:0045935	positive regulation of nucleobase-containing compound metabolic process	$9,54 \times 10^{-5}$	13
GO:0048731	system development	$9,90 \times 10^{-5}$	17
GO:0045893	positive regulation of DNA-templated transcription	$1,13 \times 10^{-4}$	12
GO:1902680	positive regulation of RNA biosynthetic process	$1,15 \times 10^{-4}$	12
GO:0006357	regulation of transcription by RNA polymerase II	$1,40 \times 10^{-4}$	14
GO:0035107	appendage morphogenesis	$1,86 \times 10^{-4}$	5
GO:0035108	limb morphogenesis	$1,86 \times 10^{-4}$	5
GO:0001228	DNA-binding transcription activator activity, RNA polymerase II-specific	$1,96 \times 10^{-4}$	7
GO:0001216	DNA-binding transcription activator activity	$2,16 \times 10^{-4}$	7
GO:0006366	transcription by RNA polymerase II	$2,24 \times 10^{-4}$	14
GO:0051254	positive regulation of RNA metabolic process	$2,54 \times 10^{-4}$	12
GO:0019219	regulation of nucleobase-containing compound metabolic process	$2,64 \times 10^{-4}$	17
GO:0032502	developmental process	$3,06 \times 10^{-4}$	21
GO:0048856	anatomical structure development	$4,49 \times 10^{-4}$	20
GO:0000978	RNA polymerase II cis-regulatory region sequence-specific DNA binding	$4,77 \times 10^{-4}$	9
GO:0048736	appendage development	$4,78 \times 10^{-4}$	5
GO:0060173	limb development	$4,78 \times 10^{-4}$	5
GO:0051173	positive regulation of nitrogen compound metabolic process	$5,42 \times 10^{-4}$	14
GO:0031325	positive regulation of cellular metabolic process	$5,45 \times 10^{-4}$	15
GO:0000987	cis-regulatory region sequence-specific DNA binding	$5,93 \times 10^{-4}$	9
GO:0006355	regulation of DNA-templated transcription	$8,25 \times 10^{-4}$	15
GO:2001141	regulation of RNA biosynthetic process	$8,49 \times 10^{-4}$	15
GO:0035115	embryonic forelimb morphogenesis	$9,20 \times 10^{-4}$	3
GO:0007275	multicellular organism development	$1,08 \times 10^{-3}$	17
GO:0034654	nucleobase-containing compound biosynthetic process	$1,19 \times 10^{-3}$	16

GO:0006351	DNA-templated transcription	$1,42 \times 10^{-3}$	15
GO:0001974	blood vessel remodeling	$1,50 \times 10^{-3}$	3
GO:0032774	RNA biosynthetic process	$1,55 \times 10^{-3}$	15
GO:0018130	heterocycle biosynthetic process	$1,59 \times 10^{-3}$	16
GO:0019438	aromatic compound biosynthetic process	$1,63 \times 10^{-3}$	16
GO:0009893	positive regulation of metabolic process	$1,69 \times 10^{-3}$	15
GO:0035136	forelimb morphogenesis	$1,78 \times 10^{-3}$	3
GO:0051252	regulation of RNA metabolic process	$2,41 \times 10^{-3}$	15
GO:1901362	organic cyclic compound biosynthetic process	$2,50 \times 10^{-3}$	16
GO:0010604	positive regulation of macromolecule metabolic process	$3,01 \times 10^{-3}$	14
GO:0071837	HMG box domain binding	$3,32 \times 10^{-3}$	2
GO:0010557	positive regulation of macromolecule biosynthetic process	$6,33 \times 10^{-3}$	12
GO:0042733	embryonic digit morphogenesis	$6,74 \times 10^{-3}$	3
GO:0030154	cell differentiation	$7,15 \times 10^{-3}$	15
GO:0048869	cellular developmental process	$7,15 \times 10^{-3}$	15
GO:0016782	transferase activity, transferring sulphur-containing groups	$7,63 \times 10^{-3}$	3
GO:0031323	regulation of cellular metabolic process	$7,94 \times 10^{-3}$	19
GO:0031328	positive regulation of cellular biosynthetic process	$8,17 \times 10^{-3}$	12
GO:0048522	positive regulation of cellular process	$8,35 \times 10^{-3}$	18
GO:0051171	regulation of nitrogen compound metabolic process	$8,49 \times 10^{-3}$	17
GO:0009891	positive regulation of biosynthetic process	$8,76 \times 10^{-3}$	12

7.3.3 Poziom mRNA wybranych genów

Analizę PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzono w celu weryfikacji wyników RNA-seq w większej grupie zwierząt, obejmując również osobniki dla których wykonano RNA-seq. Relatywny poziom mRNA wykazał istotność statystyczną ($p < 0,05$) dla 8 z 11 wybranych genów. Wśród nich *SIM1*, *PITX1*, *HOXA7* i *METTL21C* charakteryzowały się zwiększoną ekspresją u świń z przepukliną w porównaniu do grupy kontrolnej, natomiast *PVALB*, *ALX1*, *EYA2* i *TBX1* wykazywały obniżony poziom ekspresji. Wyniki dla *IRX5*, *ALX4* i *OSR2* nie osiągnęły progu istotności statystycznej, dlatego też zostały wykluczone z dalszej analizy (Rycina 6, Tabela 13). Analiza korelacji wykazała wysoką zgodność pomiędzy danymi z RNA-seq a wynikami PCR w czasie rzeczywistym, która była statystycznie istotna dla wszystkich rozpatrywanych genów ($p < 0,001$), ze współczynnikiem korelacji rang Spearmana $\rho > 0,8$, Tabela 14).



Rycina 6. Logarytm dziesiętny z względnych poziomów mRNA genów: *SIM1*, *PITX1*, *HOXA7*, *METTL21C*, *PVALB*, *ALX1*, *EYA2*, *TBX1*, *ALX4*, *OSR2* i *IRX5*, uzyskany od świń z grupy UH (świnie z przepukliną) i C (kontrola). Pionowe czarne linie przecinające ramki przedstawiają mediany, a białe krzyżyki oznaczają wartości średnie. Linie poniżej i powyżej prostokątów wskazują odpowiednio wartości minimalne i maksymalne, natomiast czarne kropki umieszczone poniżej i powyżej ramek reprezentują wartości odstające.

Tabela 13. Podsumowanie wyników z analizy RNA-seq i PCR w czasie rzeczywistym.

Geny	RNA-seq		PCR w czasie rzeczywistym				
	Log ₂ FC	Skorygowana wartość p	Wartość średnia		Odchylenie standardowe		Skorygowana wartość p
			UH	C	UH	C	
<i>SIM1</i>	3,75	1,8×10 ⁻⁴	0,0173	0,0070	0,0111	0,0096	2,6×10 ⁻⁴
<i>METTL21C</i>	3,63	6,0×10 ⁻³	0,0314	0,0157	0,0345	0,0252	1,2×10 ⁻²
<i>PITX1</i>	3,11	4,7×10 ⁻³	0,0054	0,0028	0,0048	0,0029	7,7×10 ⁻³
<i>HOXA7</i>	2.26	1,8×10 ⁻⁴	0,1562	0,0712	0,1088	0,0657	5,0×10 ⁻⁴

<i>IRX5</i>	2,19	$2,7 \times 10^{-4}$	0,0106	0,0071	0,0077	0,0073	$9,3 \times 10^{-2}$
<i>OSR2</i>	-1,44	$8,1 \times 10^{-3}$	0,0008	0,0012	0,0006	0,0011	$2,1 \times 10^{-1}$
<i>TBX1</i>	-1,79	$1,9 \times 10^{-2}$	0,0302	0,0633	0,0374	0,0577	$7,7 \times 10^{-3}$
<i>EYA2</i>	-2,28	$4,2 \times 10^{-4}$	0,0086	0,0226	0,0060	0,0143	$3,0 \times 10^{-6}$
<i>ALX4</i>	-2,34	$2,1 \times 10^{-2}$	0,0019	0,0021	0,0025	0,0023	$3,8 \times 10^{-1}$
<i>ALX1</i>	-2,89	$2,9 \times 10^{-2}$	0,0009	0,0022	0,0015	0,0042	$1,2 \times 10^{-2}$
<i>PVALB</i>	-3,71	$1,6 \times 10^{-2}$	0,0350	0,3322	0,0942	0,3272	$6,6 \times 10^{-8}$

Log₂FC: logarytm z krotności zmiany; UH: świny z przepukliną; C: kontrola

Tabela 14. Współczynniki korelacji rang Spearmana między danymi z RNA-seq a wynikami PCR w czasie rzeczywistym.

Geny	rho	Wartość p
<i>ALX1</i>	0,8424	$5,3 \times 10^{-9}$ ***
<i>EYA2</i>	0,8103	$5,8 \times 10^{-8}$ ***
<i>HOXA7</i>	0,8702	$4,2 \times 10^{-10}$ ***
<i>METTL21C</i>	0,9043	$2,3 \times 10^{-7}$ ***
<i>PITX1</i>	0,9569	$2,2 \times 10^{-16}$ ***
<i>PVALB</i>	0,8750	$4,8 \times 10^{-7}$ ***
<i>SIMI</i>	0,9008	$2,5 \times 10^{-7}$ ***
<i>TBX1</i>	0,9301	$1,1 \times 10^{-13}$ ***

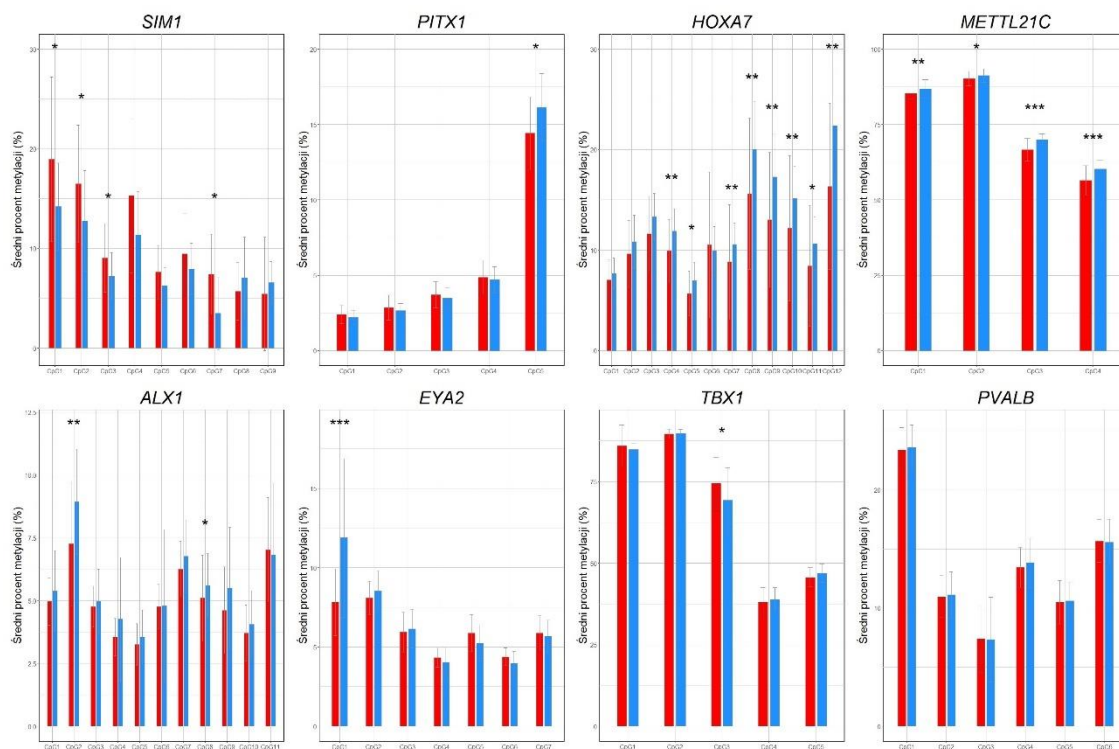
rho: Współczynnik korelacji rang Spearmana (ρ). Oznaczenia istotności statystycznej:

*** $p < 0,001$.

7.3.4 Poziomu metylacji DNA

Analiza wykazała istotne obniżenie metylacji cytozyn w genach *METTL21C*, *HOXA7* i *PITX1* co było zgodne z ich podwyższoną ekspresją. W genie *TBX1* natomiast zaobserwowano podwyższony poziom metylacji co również pokrywa się z jego wynikami ekspresji gdzie zaobserwowano obniżony poziom transkryptu. Z kolei *ALX1* i *EYA2* wykazywały obniżoną metylację, jednak nie było to spójne z wynikami RNA-seq i PCR w czasie rzeczywistym, w których stwierdzono ich niższą ekspresję w grupie zwierząt z przepukliną. Podobną rozbieżność zaobserwowano dla *SIMI*, gdzie podwyższony poziom metylacji nie pokrywał się z jednoczesnym wzrostem ekspresji (Rycina 7, Tabela 15). Test istotności dla współczynnika korelacji rang Spearmana wykazał istotną negatywną korelację dla trzech z czterech analizowanych cytozyn w genie *METTL21C* przy poziomie istotności 0,01 oraz dla ośmiu miejsc CpG w genie

HOXA7 z najsilniejszym efektem dla cytozyny dwunastej ($\rho = -0,7365$; $p < 0,0001$). Wykazano także jedną istotną negatywną korelację dla CpG w genie *TBX1* ($p < 0,001$) oraz istotną pozytywną korelację dla czterech cytozyn w genie *SIM1* przy poziomie istotności 0,01. Nie zaobserwowano istotnej korelacji między poziomem metylacji a wynikiem PCR w czasie rzeczywistym dla genów *PITX1*, *EYA2* i *ALX1* (Tabela 16).



Rycina 7. Średni procent metylacji DNA $\pm$ odchylenie standardowe w pozycjach CpG genów: *SIM1*, *PITX1*, *HOXA7*, *METTL21C*, *PVALB*, *ALX1*, *EYA2* i *TBX1* dla dwóch grup: UH (świnie z przepukliną-czerwone słupki) oraz C (kontrole-niebieskie słupki). Gwiazdki oznaczają istotność statystyczną różnic między grupą UH a kontrolną: p: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$.**

Tabela 15. Miejsca CpG w analizowanych genach wraz z ich pozycjami genomowymi, kontekstem genowym, poziomem metylacji i kierunkiem ekspresji w PCR w czasie rzeczywistym

Gen	Lokacja genomowa analizowanej sekwencji oraz kontekst genowy	Numer analizowanej cytozyny	Pozycja analizowanych cytozyn	Średni poziom w grupie UH (%)	Średni poziom w grupie C (%)	Różnice w metylacji (skorygowana wartość p)	Poziom mRNA w grupie UH względem C na podstawie PCR w czasie rzeczywistym
<i>ALX1</i>	5:96785265-5:96785446 5'- region flankujący	CpG1	5:96785422	4,9706	5,3824	$2,9 \times 10^{-1}$	obniżony
		CpG [†]	5:96785403	7,2647	8,9412	$1,2 \times 10^{-3**}$	
		CpG3	5:96785384	4,7647	4,9706	$2,9 \times 10^{-1}$	
		CpG4	5:96785382	3,5588	4,2647	$6,0 \times 10^{-1}$	
		CpG5	5:96785379	3,2647	3,5588	$1,1 \times 10^{-1}$	
		CpG6	5:96785360	4,7647	4,7941	$8,1 \times 10^{-1}$	
		CpG7	5:96785352	6,2647	6,7647	$2,3 \times 10^{-1}$	
		CpG8 [†]	5:96785333	5,1176	5,6176	$4,9 \times 10^{-2*}$	
		CpG9	5:96785298	4,6176	5,5000	$1,9 \times 10^{-1}$	
		CpG10	5:96785296	3,7059	4,0588	$4,8 \times 10^{-1}$	
		CpG11	5:96785287	7,0294	6,8235	$7,3 \times 10^{-1}$	
<i>EYA2</i>	17:48966512-17:48966631 5'- region flankujący	CpG1 [†]	17:48966545	7,8235	11,8824	$8,3 \times 10^{-4***}$	obniżony
		CpG2	17:48966572	8,0882	8,5294	$1,8 \times 10^{-1}$	
		CpG3	17:48966578	5,9412	6,1471	$5,0 \times 10^{-1}$	
		CpG4	17:48966596	4,3235	4,0294	$1,4 \times 10^{-1}$	
		CpG5	17:48966600	5,8824	5,2353	$7,8 \times 10^{-2}$	
		CpG6	17:48966602	4,3824	3,9706	$6,9 \times 10^{-2}$	
		CpG7	17:48966606	5,8824	5,6765	$5,6 \times 10^{-1}$	
<i>HOXA7</i>	18:45416762-18:45416903 5'- region flankujący	CpG1	18:45416789	7,0294	7,6765	$8,3 \times 10^{-2}$	podwyższony
		CpG2	18:45416803	9,6176	10,8235	$9,7 \times 10^{-2}$	
		CpG3	18:45416814	11,6176	13,3235	$5,4 \times 10^{-2}$	
		CpG4 [†]	18:45416829	9,9412	11,8824	$2,8 \times 10^{-3**}$	
		CpG5 [†]	18:45416831	5,6765	6,9706	$1,4 \times 10^{-2*}$	
		CpG6	18:45416843	10,5294	9,9118	$4,9 \times 10^{-1}$	
		CpG7 [†]	18:45416853	8,8235	10,5882	$1,2 \times 10^{-3**}$	
		CpG8 [†]	18:45416858	15,6176	20,0294	$8,1 \times 10^{-3**}$	
		CpG9 [†]	18:45416862	13,0294	17,2941	$3,5 \times 10^{-3**}$	
		CpG10 [†]	18:45416868	12,1765	15,1471	$1,6 \times 10^{-3**}$	
		CpG11 [†]	18:45416870	8,4412	10,6471	$1,4 \times 10^{-3**}$	
		CpG12 [†]	18:45416877	16,3529	22,4118	$2,2 \times 10^{-3**}$	
<i>METTL21C</i>	11:71021109-11:71021201 5'- region flankujący	CpG1 [†]	11:71021171	85,3824	86,8235	$1,7 \times 10^{-3**}$	podwyższony
		CpG2 [†]	11:71021168	90,2941	91,2353	$4,6 \times 10^{-2*}$	
		CpG3 [†]	11:71021150	66,6471	70,0294	$6,2 \times 10^{-5***}$	
		CpG4 [†]	11:71021135	56,4706	60,2647	$6,2 \times 10^{-5***}$	
<i>PITX1</i>	2:137207285-2:137207363 5'- region flankujący	CpG1	2:137207342	2,4118	2,2059	$1,7 \times 10^{-1}$	podwyższony
		CpG2	2:137207329	2,8529	2,6471	$5,1 \times 10^{-1}$	
		CpG3	2:137207326	3,7059	3,4706	$5,1 \times 10^{-1}$	
		CpG4	2:137207313	4,8529	4,7059	$8,3 \times 10^{-1}$	
		CpG5 [†]	2:137207302	14,4412	16,1471	$2,7 \times 10^{-2*}$	
<i>PVALB</i>	5:10955619-5:10955739 ekson 1	CpG1	5:10955644	23,3824	23,6176	$8,9 \times 10^{-1}$	obniżony
		CpG2	5:10955653	10,9706	11,1176	$8,9 \times 10^{-1}$	
		CpG3	5:10955664	7,4118	7,3529	$5,5 \times 10^{-1}$	
		CpG4	5:10955698	13,4412	13,8235	$4,9 \times 10^{-1}$	
		CpG5	5:10955702	10,5000	10,6176	$8,7 \times 10^{-1}$	
<i>SIMI</i>	1:67294867-1:67294976	CpG1 [†]	1:67294945	18,9706	14,2059	$1,6 \times 10^{-2*}$	podwyższony
		CpG2 [†]	1:67294938	16,5000	12,7647	$1,1 \times 10^{-2*}$	
		CpG3 [†]	1:67294934	9,0588	7,2353	$4,9 \times 10^{-2*}$	

	5'- region flankujący	CpG4	1:67294922	15,2941	11,3529	$8,0 \times 10^{-2}$	
		CpG5	1:67294920	7,6176	6,2647	$8,9 \times 10^{-2}$	
		CpG6	1:67294909	9,4412	7,9412	$2,3 \times 10^{-1}$	
		CpG7 [†]	1:67294900	7,4118	3,5000	$1,6 \times 10^{-3**}$	
		CpG8	1:67294898	5,7059	7,0588	$2,9 \times 10^{-1}$	
		CpG9	1:67294894	5,4412	6,5882	$2,9 \times 10^{-1}$	
<i>TBX1</i>	14:51289046-14:51289196 5'UTR	CpG1	14:51289069	86,0000	84,8529	$8,1 \times 10^{-1}$	obniżony
		CpG2	14:51289079	89,6765	89,8824	$7,1 \times 10^{-1}$	
		CpG3 [†]	14:51289109	74,5588	69,2941	$4,9 \times 10^{-2*}$	
		CpG4	14:51289133	38,1177	38,8529	$6,4 \times 10^{-1}$	
		CpG5	14:51289166	45,6471	46,9706	$1,1 \times 10^{-1}$	

UH: świnie z przepukliną; C: kontrole; †: istotne statystycznie cytozyny. Oznaczenia istotności statystycznej: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tabela 16. Współczynnikami korelacji rang Spearmana pomiędzy poziomem metylacji istotnych statystycznie miejsc CpG, a ekspresją genów z PCR w czasie rzeczywistym.

Gen	CpG porównywane do wyników z PCR w czasie rzeczywistym	rho	Wartość p
<i>ALX1</i>	CpG2	0,0223	$8,6 \times 10^{-1}$
	CpG8	-0,0152	$9,0 \times 10^{-1}$
<i>EYA2</i>	CpG2	0,0335	$7,9 \times 10^{-1}$
<i>HOXA7</i>	CpG4	-0,5278	$3,7 \times 10^{-6***}$
	CpG5	-0,4305	$2,5 \times 10^{-4***}$
	CpG7	-0,5496	$1,2 \times 10^{-6***}$
	CpG8	-0,6643	$6,6 \times 10^{-10***}$
	CpG9	-0,6929	$5,9 \times 10^{-11***}$
	CpG10	-0,6539	$1,5 \times 10^{-9***}$
	CpG11	-0,6174	$2,0 \times 10^{-8***}$
	CpG12	-0,7365	$8,2 \times 10^{-13***}$
<i>METTL21C</i>	CpG1	-0,2329	$5,6 \times 10^{-2}$
	CpG2	-0,5183	$6,0 \times 10^{-6***}$
	CpG3	-0,3369	$5,0 \times 10^{-3**}$
	CpG4	-0,4015	$6,9 \times 10^{-4***}$
<i>PITX1</i>	CpG5	0,1753	$1,5 \times 10^{-1}$
<i>SIMI</i>	CpG1	0,6393	$4,4 \times 10^{-9***}$
	CpG2	0,6536	$1,5 \times 10^{-9***}$
	CpG3	0,4505	$1,2 \times 10^{-4***}$
	CpG7	0,3844	$1,2 \times 10^{-3**}$
<i>TBX1</i>	CpG3	-0,3933	$9,1 \times 10^{-4***}$

rho: współczynnik korelacji rang Spearmana (ρ). Oznaczenia istotności statystycznej: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

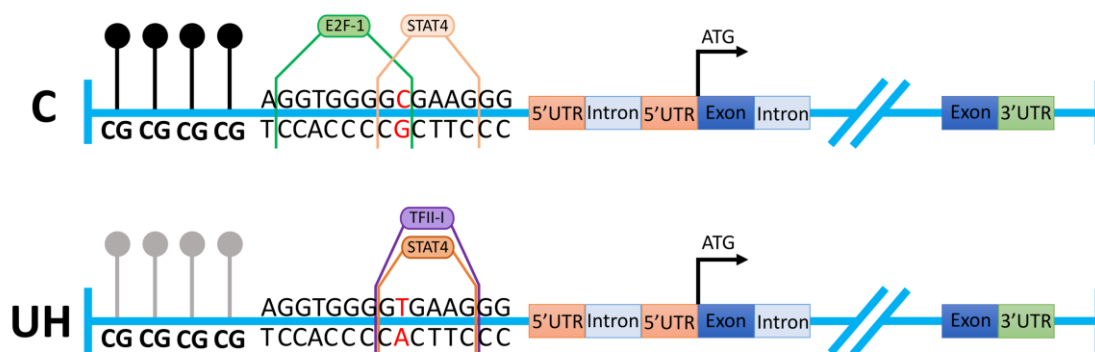
7.3.5 Analiza polimorfizmów DNA

Analiza wykazała obecność licznych polimorfizmów w badanych fragmentach genów. Porównanie częstości alleli między zwierzętami z przepukliną pępkową a grupą kontrolną, przeprowadzone za pomocą testu ilorazu szans, wykazało istotność statystyczną ($p = 0,03$) dla jednego SNP w genie *METTL21C*: rs330073569. Obserwowana częstość allelu T u świń z przepukliną była wyższa (0,43) niż w grupie kontrolnej (0,25). Dodatkowa analiza *in silico* ujawniła, że zidentyfikowany polimorfizm znajduje się w obrębie sekwencji rozpoznawanej przez czynniki transkrypcyjne E2F-1 oraz STAT4 (Rycina 8, Tabela 17). Obecność wariantu T prowadzi do utraty miejsca wiązania dla E2F-1, jednocześnie tworząc nowe miejsce wiązania dla TFII-I oraz wzmacniając dopasowanie dla STAT4. Ponadto, w regionie, w którym zidentyfikowano ten SNP, analiza *in silico* (narzędzie Neural Network Promoter Prediction) wykazała obecność sekwencji o charakterze promotora z wynikiem punktowym 0,98 (sugeruje to, że analizowany wariant leży prawdopodobnie w promotorze genu i może mieć znaczenie dla wiązania czynników transkrypcyjnych regulujących jego poziom ekspresji).

Tabela 17. Procent różnicy w dopasowaniu do sekwencji pomiędzy motywem a odpowiadającym mu czynnikiem transkrypcyjnym dla wariantu referencyjnego i alternatywnego w regionie potencjalnego promotora genu *METTL21C*.

Czynnik transkrypcyjny	Odmienności motywów wiążących	
	Referencyjny wariant C	Alternatywny wariant T
STAT4 (T01577)	4,41%	2,94%
E2F-1 (T01542)	10,52%	NA
TFII-I (T00824)	NA	14,27%

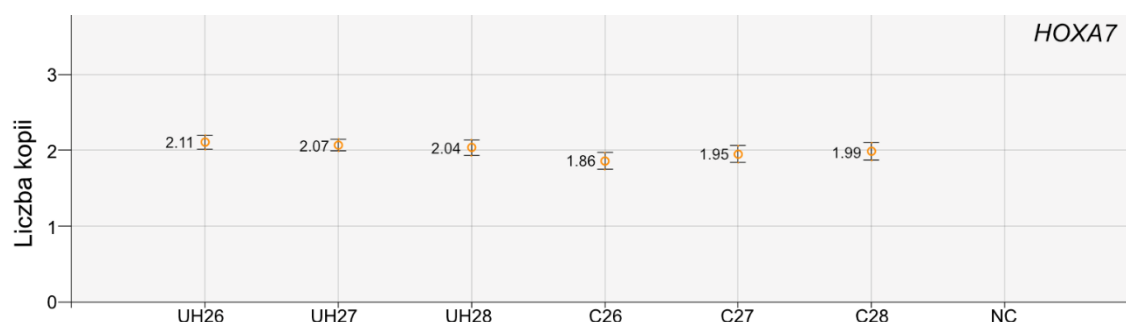
wyższy procent odmienności (*ang. dissimilarity*) oznacza większą różnicę pomiędzy motywem a odpowiadającym mu czynnikiem transkrypcyjnym; mniejszy procent oznacza wyższe podobieństwo pomiędzy motywem i czynnikiem transkrypcyjnym.



Rycina 8. Fragment sekwencji potencjalnego regionu promotora genu *METTL21C* z zaznaczonym SNP (oba warianty), miejscami wiązania czynników transkrypcyjnych, odpowiadającymi im czynnikami transkrypcyjnymi oraz schematycznym przedstawieniem niższego poziomu metylacji DNA (szare kółka) czterech cytozyn w przypadkach UH w porównaniu do grupy kontrolnej (czarne kółka).

7.3.6 Zmienność liczby kopii

W żadnej z badanych grup nie wykryto obecności polimorfizmu typu CNV. Wszystkie analizowane geny (*SIM1*, *PITX1*, *HOXA7*, *METTL21C*, *PVALB*, *ALX1*, *EYA2* i *TBX1*) charakteryzowała obecność dwóch kopii, zarówno w grupie zwierząt z przepukliną jak i w grupie kontrolnej. Przykładowy wynik dla genu *HOXA7* przedstawia Rycina 9.

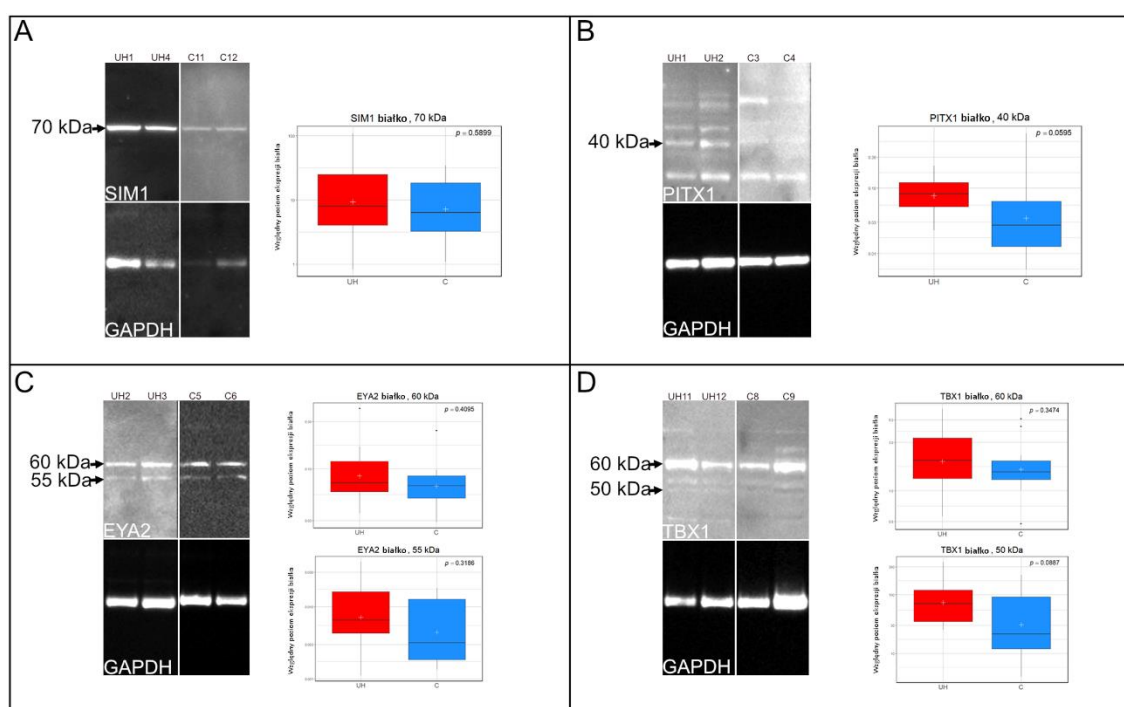


Rycina 9. Identyfikacja 2 kopii genu *HOXA7* u trzech osobników z grupy UH oraz trzech zwierząt z grupy kontrolnej metodą ddPCR. NC: kontrola negatywna (brak

DNA), UH: świnie z przepukliną, C: kontrole. Słupki błędów przedstawiają 95% przedział ufności.

7.3.7 Poziom białka

Analiza western blot dla tkanki mięśniowej, przeprowadzona dla wytypowanych czterech białek wykazała obecność dwóch izoform dla EYA2 (60 kDa i 55 kDa) i TBX1 (60 kDa i 50 kDa) oraz jednej dla PITX1 (40 kDa) i SIM1(70 kDa) (Rycina 10). Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w poziomie białek, pomiędzy grupą zwierząt z przepukliną, a grupą kontrolną.



Rycina 10. Poziom białek u zwierząt z grupy UH (świnie z przepukliną) i C (kontrole) – wyniki analizy western blot dla badanych białek względem GAPDH (białko referencyjne) oraz względna ekspresja w analizowanych grupach. A – wyniki dla SIM1, B – wyniki dla PITX1, C – wyniki dla EYA2, D – wyniki dla TBX1. Pionowe czarne linie przecinające ramki przedstawiają mediany, białe krzyżyki oznaczają wartości średnie. Linie poniżej i powyżej prostokątów wskazują odpowiednio wartości

maksymalne i minimalne, natomiast czarne kropki umieszczone poniżej i powyżej ramek reprezentują wartości odstające.

7.3.8 Analiza frekwencji wariantów DNA wytypowanych w RNA-seq

Sekwencjonowanie RNA wykazało obecność 72301 SNP w regionach ulegających transkrypcji. Test Fishera wykazał istotne statystycznie różnice ($p < 0,05$) dla 979 wariantów (79 prowadzące do zmiany sensu, 33 regionie 5'UTR, 284 w 3'UTR). Do dalszej analizy na większej stawce zwierząt, bazując na współczynniku logFC dla genów z analizy RNA-seq i wartości p z testu Fishera, wybrano 4 warianty: rs341151132 (*GALNT16*), rs690269483 (*PAOX*), rs334837422 (*RFTNI*) i rs318378401 (*SLC9A1*), które poddano sekwencjonowaniu metodą Sangera. Przeprowadzony test Fishera wykazał brak istotnych różnic w częstościach alleli dla analizowanych wariantów pomiędzy grupą świń z przepukliną, a zdrowymi osobnikami (Tabela 18).

Tabela 18. Częstości alleli rs341151132 w genie *GALNT16*, rs690269483 w genie *PAOX*, rs334837422 w genie *RFTNI* oraz rs318378401 w genie *SLC9A1*.

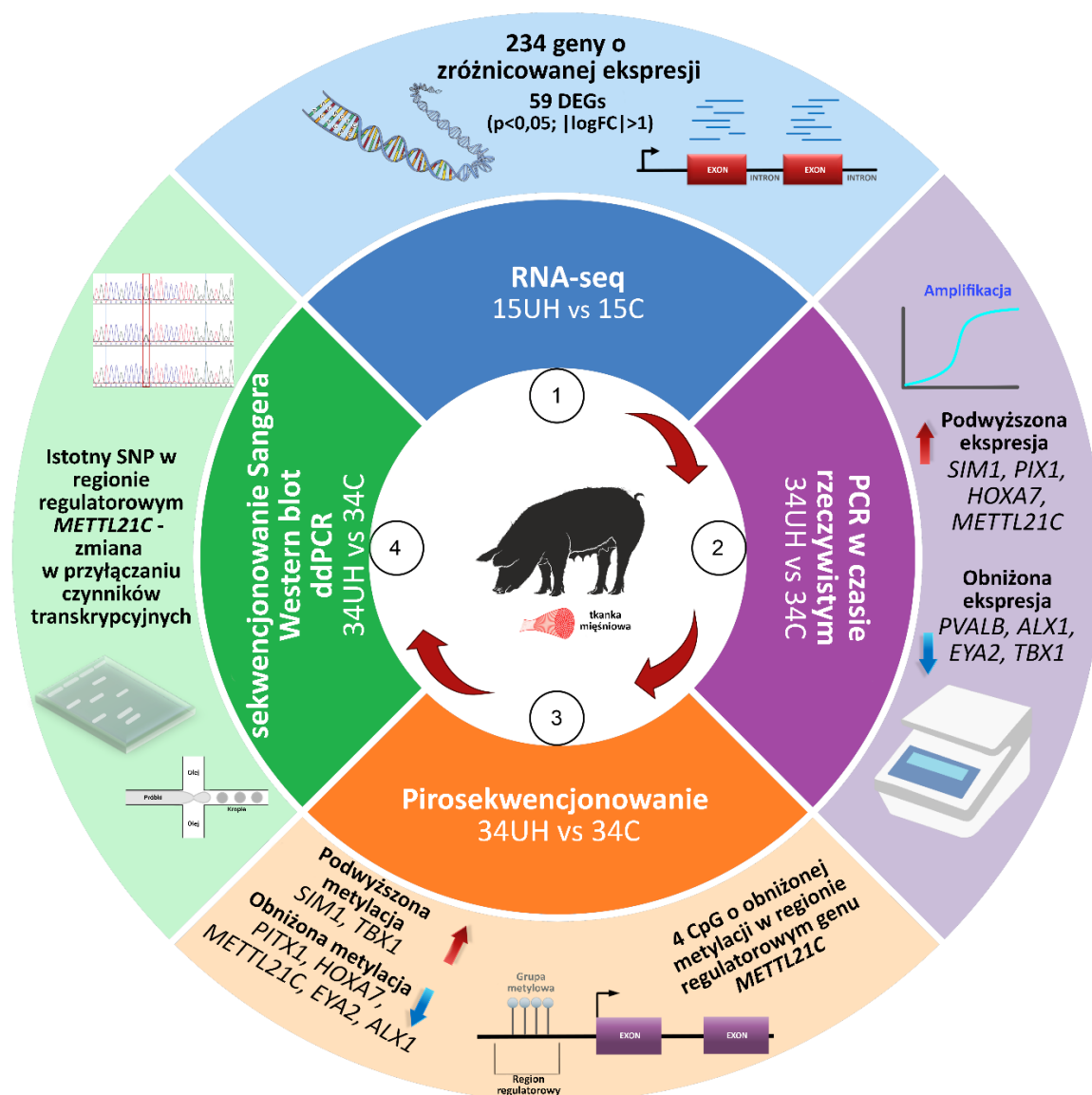
Gen	Wariant (rs ID) i lokalizacja w genomie	Allele	Frekwencja		Wartość p	Iloraz szans
			UH	C		
<i>GALNT16</i>	rs341151132 Ref:C > Alt:T 7:93017882	C	0,81	0,69	0,1159	0,53
		T	0,19	0,31		
<i>RFTNI</i>	rs334837422 Ref:C > Alt:T 13:3524357	C	0,74	0,81	0,3085	1,52
		T	0,26	0,19		
<i>PAOX</i>	rs690269483 Ref:A > Alt:G 14:141364546	A	0,65	0,75	0,1925	1,64
		G	0,35	0,25		
<i>SLC9A1</i>	rs318378401 Ref:A > Alt:G 6:84372805	A	0,24	0,32	0,2531	1,55
		G	0,76	0,68		

Ref: wariant referencyjny; Alt: wariant alternatywny; UH: świny z przepukliną; C: kontrole

7.3.9 Znaczenie wyników

Przeprowadzone analizy ujawniły istotne różnice w ekspresji genów, poziomach metylacji oraz obecności polimorfizmów między grupą świń z przepukliną pępkową a grupą kontrolną. Wyniki te wskazują na potencjalne mechanizmy molekularne związane z rozwojem tej wady. Identyfikacja genów różniących się istotnie pod względem ekspresji, w tym *SIMI*, *PITX1*, *HOXA7* i *METTL21C* o zwiększonym poziomie oraz *PVALB*, *ALX1*, *EYA2* i *TBX1* o obniżonej ekspresji, dostarcza nowych informacji o genetycznych podstawach występowania przepukliny. Wyniki analizy metylacji DNA potwierdzają, zwłaszcza dla genów *TBX1*, *METTL21C* i *HOXA7*, że epigenetyczna regulacja ekspresji genów jest jednym z czynników zmian w poziomie mRNA genów, których zmieniony poziom mRNA może uczestniczyć w mechanizmach prowadzących do rozwoju badanej wady. Ponadto wykrycie polimorfizmu rs330073569 w genie *METTL21C*, który potencjalnie wpływa na zmiany w wiązaniu czynników transkrypcyjnych, sugeruje, że warianty genetyczne mogą modyfikować poziom ekspresji genów potencjalnie związanych z wystąpieniami tej wady. Całość wyników dostarcza nowych informacji i może stanowić podstawę do dalszych badań nad identyfikacją markerów genetycznych i epigenetycznych predysponujących do występowania przepukliny pępkowej świń.

Graficzne podsumowanie niniejszych wyników przedstawia Rycina 11.



Rycina 11. Graficzne podsumowanie wyników eksperymentu 3.

7.4 Eksperyment dodatkowy

7.1.1 Związek zaobserwowanych wariantów DNA w genach *MYO19*, *MYH2*, *MYH8*, *ZNF646* i *ZNF713* z występowaniem przepukliny pępkowej świń

Sekwencjonowanie Sangera ujawniło obecność 4 SNP w genie *MYO19*, 3 SNP w *MYH2*, 10 SNP w *MYH8*, 2 w *ZNF646*, 6 dla fragmentu 3:16963944-16964237 (ekson 5) w *ZNF713* i 2 dla fragmentu 3:16960765-16961307 (ekson 6) w *ZNF713*. Obliczony

iloraz szans wykazał związek wariantu rs335136145 w genie *MYO19*, w panelu 2 z występowaniem przepukliny pępkowej – Tabela 19 (został spełniony warunek równowagi Hardy’ego-Weinberga). Wyniki dla pozostałych SNP były nieistotne statystycznie (Tabela 20, Tabela 21).

Tabela 19. Częstości alleli wraz z ilorazem szans i wartością p dla wariantów SNP w genie *MYO19*, w panelu 2.

Gen	Wariant (rs ID) i lokalizacja w genomie	Wariant aminokwasu	Allele	Panel 2				
				Frekwencja		Wartość p	Skorygowana wartość p	Iloraz szans
				UH	C			
<i>MYO19</i>	rs335136145 Ref:G > Alt:A 12:38026003	p.678Pro>Ser	G	0,75	0,86	0,0122	0,0488*	2,03
			A	0,25	0,14			
	rs335471378 Ref:T > Alt:C 12:38025918	intron	T	0,96	0,95	0,5713	0,9954	0,73
			C	0,04	0,05			
	rs323111950 Ref:G > Alt:A 12:38025929	intron	G	0,90	0,91	0,9723	0,9954	0,99
			A	0,1	0,09			
	rs324107731 Ref:G > Alt:A 12:38026006	p.677Arg>Cys	G	1	1	0,9954	0,9954	0,99
			A	0	0			

Ref-allel referencyjny; Alt-allel alternatywny; UH-przepuklina pępkowa, C-kontrola;

*wynik istotny statystycznie

Tabela 20. Częstości alleli wraz z ilorazem szans i wartością p dla wariantów SNP w genach *MYO19*, *ZNF646*, *ZNF646*, *MYH2*, *MYH8* i *ZNF713* w panelu 1.

Gen	Wariant (rs ID) i lokalizacja w genomie	Wariant aminokwasu	Allele	Panel 1				
				Frekwencja		Wartość p	Skorygowana wartość p	Iloraz szans
				UH	C			
<i>MYO19</i>	rs335136145 Ref:G > Alt:A 12:38026003	p.678Pro>Ser	G	0,79	0,82	0,2507	0,5014	1,22
			A	0,21	0,18			
	rs335471378	intron	T	0,99	0,998	0,1050	0,4200	5,78

	Ref:T > Alt:C 12:38025918		C	0,01	0,003			
	rs323111950 Ref:G > Alt:A 12:38025929	intron	G	0,98	0,97	0,5621	0,5621	0,76
			A	0,02	0,03			
	rs324107731 Ref:G > Alt:A 12:38026006	p.677Arg>Cys	G	0,998	1	0,5197	0,5621	2,86
			A	0,002	0			
ZNF646	rs337670844 C>T 3:17399477	intron	C	1	1	1	-	1
			T	0	0			
	rs327947675 A>G 3:17399455	intron	A	0,96	0,96	1	-	1
			G	0,04	0,04			
	rs328458889 C>T 3:17399519	intron	C	0,96	0,98	0,5656	-	2
			T	0,04	0,02			
MYH2	rs3472840180 G>C 12:55267170	p.751Ala>Gly	G	0,83	0,88	0,4052	-	1,61
			C	0,17	0,12			
	rs1110561778 C>T 12:55267349	intron	C	1	1	1	-	1
			T	0	0			
	rs1111337299 G>A 12:55267293	intron	G	1	1	1	-	1
			A	0	0			
MYH8	rs3470533027 T>G 12:55146905	p.907Asn>Thr	T	0,83	0,88	0,4052	-	1,61
			G	0,17	0,12			
	rs3471313869 G>A 12:55147203	intron	G	1	1	1	-	1
			A	0	0			
	rs3471698357 C>G 12:55147155	intron	C	1	1	1	-	1
			G	0	0			
	rs3475790098 G>C 12:55147135	intron	G	1	1	1	-	1
			C	0	0			
	rs3473525619 G>A 12:55146985	intron	G	1	1	1	-	1
			A	0	0			
	rs3471216414 G>T 12:55146993	intron	G	1	1	1	-	1
			T	0	0			
	rs3471972859 C>T 2:55146865	wariant synonimiczny	C	1	1	1	-	1
			T	0	0			
	rs3473444225		G	1	1	1	-	1

	G>A 12:55146835	wariant synonimiczny	A	0	0			
	rs3469936522 C>G 12:55146832	p.931Glu>Asp	C	1	1	1	-	1
			G	0	0			
	rs3475856034 C>T 12:55146826	wariant synonimiczny	C	1	1	1	-	1
			T	0	0			
ZNF713 ekson 5	rs323115420 T>A 3:16964045	p.100His>Leu	T	0,92	1	0,1848	-	7,38
			A	0,08	0			
	rs324689981 A>C 3:16963968	intron	A	0,92	1	0,1848	-	7,38
			C	0,08	0			
	rs330731511 T>C 3:16963981	intron	T	0,85	0,86	0,9283	-	1,06
			C	0,15	0,14			
	rs343927846 C>T 3:16964030	intron	C	0,85	0,86	0,9283	-	1,06
			T	0,15	0,14			
	rs332641645 T>C 3:16964090	p.85Gln>Arg	T	1	1	1	-	1
			C	0	0			
	rs344893082 C>A 3:16964138	wariant w rejonie splicingowym	C	0,85	0,84	0,7940	-	0,85
			A	0,15	0,16			
ZNF713 ekson 6	rs337918521 C>A 3:16960969	p.378Ala>Ser	C	0,85	1	0,1301	-	9,74
			A	0,15	0			
	rs320802395 G>A 3:16961030	wariant synonimiczny	G	0,94	1	0,1529	-	8,86
			A	0,06	0			

Ref-allel referencyjny; Alt-allel alternatywny; UH-przepuklina pępkowa; C-kontrola

Tabela 21. Częstości alleli wraz z ilorazem szans i wartością p dla wariantów SNP w genach ZNF646, ZNF646, MYH2, MYH8 i ZNF713 w panelu 2.

Gen	Wariant (rs ID) i lokalizacja w genomie	Wariant aminokwasu	Allele	Panel 2				
				Frekwencja		Wartość p	Skorygowana wartość p	Iloraz szans
				UH	C			
ZNF646	rs337670844 C>T 3:17399477	intron	C	1	1	1	-	1
			T	0	0			
	rs327947675	intron	A	0,84	0,91	0,2863	-	2

	A>G 3:17399455		G	0,16	0,09			
	rs328458889 C>T 3:17399519	intron	C	1	1	1	-	1
			T	0	0			
MYH2	rs3472840180 G>C 12:55267170	p.751Ala>Gly	G	0,83	0,71	0,1663	-	0,52
			C	0,17	0,29			
	rs1110561778 C>T 12:55267349	intron	C	0,92	0,92	1	-	1
			T	0,08	0,08			
	rs1111337299 G>A 12:55267293	intron	G	0,92	0,92	1	-	1
			A	0,08	0,08			
MYH8	rs3470533027 T>G 12:55146905	p.907Asn>Thr	T	0,83	0,88	0,4052	-	1,61
			G	0,17	0,12			
	rs3471313869 G>A 12:55147203	intron	G	0,92	0,92	1	-	1
			A	0,08	0,08			
	rs3471698357 C>G 12:55147155	intron	C	0,92	0,92	1	-	1
			G	0,08	0,08			
	rs3475790098 G>C 12:55147135	intron	G	0,92	0,92	1	-	1
			C	0,08	0,08			
	rs3471216414 G>T 12:55146993	intron	G	0,92	0,92	1	-	1
			T	0,08	0,08			
	rs3473525619 G>A 12:55146985	intron	G	0,92	0,92	1	-	1
			A	0,08	0,08			
	rs3471972859 C>T 2:55146865	wariant synonimiczny	C	0,92	0,92	1	-	1
			T	0,08	0,08			
	rs3473444225 G>A 12:55146835	wariant synonimiczny	G	0,92	0,92	1	-	1
			A	0,08	0,08			
	rs3469936522 C>G 12:55146832	p.931Glu>Asp	C	0,92	0,92	1	-	1
			G	0,08	0,08			
	rs3475856034 C>T 12:55146826	wariant synonimiczny	C	0,92	0,92	1	-	1
			T	0,08	0,08			
ZNF713 ekson 5	rs323115420 T>A 3:16964045	p.100His>Leu	T	0,86	0,89	0,6686	-	1,34
			A	0,14	0,11			
	rs324689981	intron	A	0,86	0,89	0,6686	-	1.34

	A>C 3:16963968		C	0,14	0,11			
	rs330731511 T>C 3:16963981	intron	T	0,93	0,97	0,3974	-	2,71
			C	0,07	0,03			
	rs343927846 C>T 3:16964030	intron	C	0,95	0,97	0,7669	-	1,32
			T	0,05	0,03			
	rs332641645 T>C 3:16964090	p.85Gln>Arg	T	0,98	1	0,5535	-	2,66
			C	0,02	0			
ZNF713 ekson 6	rs344893082 C>A 3:16964138	wariant w rejonie splicingowym	C	0,95	0,97	0,7669	-	1,32
			A	0,05	0,03			
	rs337918521 C>A 3:16960969	p.378Ala>Ser	C	0,69	0,88	0,1243	-	2,97
			A	0,31	0,12			
	rs320802395 G>A 3:16961030	wariant synonimiczny	G	0,85	0,94	0,1922	-	2.57
			A	0,15	0,06			

Ref-allel referencyjny; Alt-allel alternatywny; UH-przepuklina pępkowa; C-kontrola

7.1.4 Znaczenie wyników

Dzięki przeprowadzonej analizie otrzymano wyniki, które potwierdzają związek wytypowanego wariantu w genie *MYO19* z ryzykiem występowania przepukliny, co potwierdza częściowo wcześniej otrzymane wyniki przez zespół Savoldi i in. (2021).

Należy jednak zaznaczyć, że otrzymano statystycznie istotny wynik tylko dla jednego panelu oraz nie udało się potwierdzić związku pozostałych badanych SNP. Świadczy to o złożonym charakterze przepukliny i prawdopodobnym wielogenowym podłożu.

Graficzne podsumowanie niniejszych wyników przedstawia Rycina 12.

Sekwencjonowanie Sangera

MYO19: 212UH vs 200C oraz 86UH vs 85C

MYH2, MYH8, ZNF646, ZNF713: 26UH vs 26C oraz 26UH vs 26C

Wykryto:

- ❖ 4 SNP w *MYO19*
- ❖ 3 SNP w *MYH2*
- ❖ 10 SNP w *MYH8*
- ❖ 6 SNP w *ZNF646*
- ❖ 8 SNP w *ZNF713* (ekson 5)
- ❖ 4 SNP w *ZNF713* (ekson 6)



Obliczony iloraz szans:

- ❖ Istotny związek wariantu rs335136145 w genie *MYO19*, w panelu 2 (86UH vs 85C) z występowaniem UH



Rycina 12. Graficzne podsumowanie wyników eksperymentu dodatkowego.

8. Dyskusja

Dostępne w literaturze informacje na temat podłoża przepuklin pępkowych świń są nadal ograniczone. Pomimo wcześniejszych prób identyfikacji czynników genetycznych odpowiedzialnych za rozwój tej wady, mechanizmy prowadzące do jego powstawania nie zostały jeszcze w pełni poznane. W efekcie nadal brakuje skutecznych metod selekcji w celu wyeliminowania bądź ograniczenia występowania przepukliny w populacji świń. Dodatkowym wyzwaniem w badaniach jest istotny wpływ czynnika środowiskowego jak również poligeniczny charakter tej wady. Należy mieć też na uwadze, że przyczyny powstawania przepukliny pępkowej mogą różnić się w zależności od rasy czy populacji. Dlatego tak istotne jest prowadzenie badań na zróżnicowanych genetycznie grupach, aby uzyskać bardziej reprezentatywne i wiarygodne wyniki.

8.1 Markery genetyczne związane z występowaniem przepuklin pępkowej

Badania nad genetycznym podłożem przepuklin pępkowych świń stanowią kluczowy krok w zrozumieniu mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za rozwój tej wady. Markery molekularne, umożliwiające identyfikacje polimorfizmów na poziomie DNA, odgrywają kluczową rolę w genetyce zwierząt (Vignal i in., 2002). Analiza markerów genetycznych pozwala na identyfikację genów kandydujących, których warianty mogą predysponować do występowania przepukliny. Tego typu badania są szczególnie istotne w kontekście hodowli zwierząt gospodarskich, gdzie wady rozwojowe, takie jak przepuklina pępkowa, mogą prowadzić do strat ekonomicznych oraz obniżenia dobrostanu zwierząt.

Zmiana w obrębie sekwencji genu określana jest powszechnie mutacją. Obecnie jednak rozróżnia się mutacje i polimorfizmy, w zależności od częstotliwości występowania zmienionego allelu w populacji. W przeciwieństwie do mutacji, zmieniony allel w polimorfizmie zazwyczaj nie wpływa na funkcję białka ani nie jest letalny. Dlatego tego typu allele określa się mianem wariantów – alleli alternatywnych, bez wyraźnego wskazania, który allel jest „prawidłowy”. Należy jednak zauważyć, że w niektórych przypadkach zmiany w sekwencji mogą mieć negatywne skutki, nawet jeśli częstość występowania danego wariantu przekracza 5% (Charon i Świtoński, 2012).

Polimorfizmy genetyczne, zwłaszcza polimorfizmy pojedynczego nukleotydu – SNP, odgrywają kluczową rolę w badaniach nad cechami produkcyjnymi zwierząt (Vignal i in., 2002; Charon i Świtoński, 2012). SNP są jedną z najczęściej występujących form zmienności genetycznej ludzi (Kim i Misra, 2007). Polimorfizmy te mogą wpływać na wszystkie etapy ekspresji genów. SNP w części kodującej może prowadzić do zmian sekwencji białka, natomiast w obrębie regionów regulatorowych może zaburzać przyłączanie się czynników transkrypcyjnych tym samym mieć znaczący wpływ na ekspresję (Robert i Pelletier, 2018).

Wśród dotychczasowo wykrytych polimorfizmów znacząco wpływających na produkcję można wyróżnić mutacje w genie *RYRI* warunkującą pogorszenie jakości mięsa u trzody chlewnej czy polimorfizm w *DGATI*, który ma związek z zawartością tłuszczu i białka w mleku u bydła (Charon i Świtoński, 2012). Również w przypadku przepuklin pępkowych świń rozpoczęto badania zmierzające do identyfikacji wariantów mogących predysponować do występowania defektu. Genetyczne tło przepuklin, obejmuje współdziałanie wielu genów oraz interakcje genetyczno-środowiskowe. Identyfikacja markerów genetycznych może umożliwić lepsze zrozumienie etiologii tej wady, a także tworzy podstawy do wprowadzenia narzędzi selekcji, które w przyszłości mogą znacząco ograniczyć jej występowanie.

W niniejszych badaniach analizowano częstości występowania wariantów SNP w genach *CAPN9*, *ITGAM* i *OSM*, a także CNV w genie *NUGGC*. Geny te zostały wytypowane we wcześniejszych publikacjach jako mające związek z rozwojem przepukliny pępkowej świń. Jak wspomniano wcześniej, przyczyny powstawania przepukliny pępkowej mogą różnić się w zależności od rasy czy populacji. Dlatego też w niniejszej pracy postanowiono zweryfikować wcześniejsze wyniki na innej grupie zwierząt, różniącej się pod względem genetycznym, aby określić, czy zaobserwowane zależności mają charakter uniwersalny, czy są specyficzne dla określonych puli genowych. Badania przeprowadzono na większej liczbie osobników, co pozwoliło na uzyskanie bardziej reprezentatywnych wyników i zwiększenie mocy statystycznej analizy. Umożliwiło także dokładniejsze określenie potencjalnych różnic między grupami.

Gen *CAPN9* został wskazany w badaniach Li i in. (2019), jako potencjalnie związany z występowaniem przepukliny pępkowej. Jego ekspresja obserwowana jest głównie w przewodzie pokarmowym gdzie tworzy kompleks proteazowy „G-calpain” w połączeniu

z *CAPN8* (Hata i in., 2016). W niniejszej pracy, porównanie częstości występowania alleli pomiędzy badanymi grupami wykazało istotne różnice dla 4 SNP w genie *CAPN9*, w panelu pierwszym (grupa stanowiąca mieszańce ras landrace, duroc i yorkshire). Zaobserwowano także istotną interakcję między płcią a haplotypem CTCGCCCTTG, jednak tylko w panelu 2, składającym się z osobników będących krzyżówką ras duroc, large white i pietrain. Nie zaobserwowano istotnych wyników dla panelu 1.

Gen *ITGAM*, w pracy Rodrigues i in. (2021), został wytypowany w analizie *in silico*. Koduje on podjednostkę receptora integryna- α M β 2, pełniącej istotną rolę w aktywacji, adhezji i migracji leukocytów (Anaya i in., 2012). W ramach uzyskanych wyników własnych zaobserwowano, że haplotyp AT zmniejszał ryzyko wystąpienia UH o 45%, jednak podobnie jak w przypadku *CAPN9* tylko w panelu 2.

Gen *OSM*, koduje białko onkostatynę M, która jak odpowiedzialna za różnicowanie komórek, odpowiedź zapalną czy promowanie wzrostu (Grindflek i in., 2018; Stawski i Trojanowska, 2019). W pracy Grindflek i in. (2018), wykazano jego powiązanie z przepukliną co znalazło odzwierciedlenie w niniejszych badanych gdzie wskazano, że haplotyp CAGGA zmniejsza ryzyko wystąpienia przepukliny o 52%, jednak tylko, ponownie w panelu 2.

W przypadku genu *NUGGC*, wskazanego w badaniu Long i in. (2016), wyniki uzyskane w ramach tej pracy nie wykazały związku między występowaniem CNV tego genu a przepukliną w dwóch badanych panelach zwierząt.

W ramach weryfikacji, wytypowanych genów kandydujących i zidentyfikowanych w ich obrębie polimorfizmów, przeprowadzono badania dodatkowe kolejnych genów: *MYH2*, *MYH8*, *MYO19*, *ZNF646* i *ZNF713*. Zespół Savoldi i in. (2021), bazując na analizie sekwencjonowania RNA, zidentyfikował polimorfizmy w wymienionych genach i wskazał na ich możliwy związek z przepukliną pępkową. W ramach dodatkowego eksperymentu przeprowadzonego w ramach tej pracy, przeanalizowano metodą Sangera wybrane fragmenty genów zawierające wskazane polimorfizmy SNP. Analiza potwierdziła związek polimorfizmu rs335136145 w genie *MYO19* z występowaniem przepukliny. Porównanie grupy badanej z kontrolną wykazało istotność statystyczną dla tego polimorfizmu. Należy jednak zaznaczyć, że wynik ten otrzymano jedynie dla panelu 2. Co istotne, w pierwotnej pracy (Savoldi i in. 2021) analizowano czystorasowe świny rasy landrace, natomiast w panelu 1, obejmującym zwierzęta będące krzyżówką tej rasy,

nie udało w niniejszych badaniach wykazać związku tego polimorfizmu z występowaniem przepukliny.

8.2 Wpływ różnic w poziomie transkryptów na występowanie przepukliny pępkowej w różnych typach tkanek

Przepuklina pępkowa świń jest wieloczynnikowym zaburzeniem rozwojowym, którego etiologia obejmuje zarówno czynniki genetyczne, jak i środowiskowe. W ostatnich latach coraz większą uwagę zwraca się na molekularne mechanizmy leżące u podstaw tej wady. Poza poszukiwaniem polimorfizmów związanych z występowaniem przepukliny, coraz większą rolę przykładą się do ekspresji genów w różnych typach tkanek. Zmiany w poziomach transkryptów mogą wpływać na procesy biologiczne związane z prawidłowym rozwojem powłok brzusznych, funkcjonowaniem macierzy zewnątrzkomórkowej czy regulacją szlaków sygnalizacyjnych kluczowych dla stabilności tkanki łącznej (Franz, 2006; Souza i in., 2020).

Analiza różnic w ekspresji genów pomiędzy osobnikami zdrowymi a dotkniętymi przepukliną może dostarczyć cennych informacji dotyczących zarówno genetyki jak i epigenetycznych podstaw tej wady. Szczególne znaczenie ma porównanie ekspresji transkryptów w różnych typach tkanek, takich jak tkanka mięśniowa czy tkanka łączna, które mogą różnić się pod względem aktywności tych samych genów. Należy również zaznaczyć, że podobnie jak w przypadku polimorfizmów genetycznych, zmiany w poziomach transkryptów związanych z przepukliną mogą wykazywać zróżnicowanie w zależności od rasy czy populacji. Sugeruje to istnienie specyficznych dla populacji mechanizmów molekularnych wpływających na predyspozycję do tej wady. Dlatego istotne jest prowadzenie badań na różnych rasach świń, o zróżnicowanym tle genetycznym. Pozwoli to na lepsze zrozumienie mechanizmów molekularnych leżących u podstaw podatności na przepuklinę pępkową oraz identyfikację potencjalnych czynników genetycznych i epigenetycznych specyficznych dla danej populacji.

W drugim badaniu własnym przeanalizowane zostały poziomy mRNA czterech genów wskazanych przez Souza i in. (2020): *ACAN*, *COL6A5*, *MMP13* i *VIT*. Autorzy, opierając się na wynikach RNA-seq, wykazali ich związek z występowaniem przepuklin pępkowych świń, analizując materiał wyizolowany z pierścienia pępkowego

czystorasowych osobników rasy landrace, bez rozróżniania typów tkanek. W niniejszej pracy, wykorzystując technikę PCR w czasie rzeczywistym, analizowano tkanki pobrane od zwierząt o odmiennym profilu genetycznym – mieszańce ras duroc, landrace i yorkshire. Ponadto badanie przeprowadzono na większej liczbie zwierząt, a analizę rozszerzono o wykonanie oddzielnie analiz poziomu mRNA w tkance mięśniowej i łącznej, co stanowiło nowatorskie podejście w badaniach nad przepuklinami pępkowymi świń.

Interesujące wyniki otrzymano dla dwóch genów *MMP13* i *VIT*. Ekspresja pierwszego z nich – *MMP13*, była podwyższona w tkance mięśniowej, a obniżona w tkance łącznej u świń z przepukliną w porównaniu do kontroli. Jest to wynik przeciwny do otrzymanego przez zespół Souza i in. (2020). Rozbieżności te mogą wynikać z faktu, że w poprzednim badaniu nie stosowano rozróżnienia na tkankę mięśniową i łączną. Gen *MMP13* koduje białko kolagenazę 3 należącą do rodziny metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej. Odpowiadają one za degradację składników macierzy oraz są zaangażowane w przebudowę tkanki łącznej (Bracale i in., 2023). Dodatkowo warto zauważyć, że we wcześniejszym badaniu gen ten został powiązany z przepukliną pachwinową ludzi (Zheng i in., 2002). Obserwowany obniżony poziom transkryptu w tkance łącznej świń z przepukliną może prowadzić do zaburzeń w procesie przebudowy tkanki, co potencjalnie osłabia jej strukturę i może predysponować do rozwoju przepukliny. Natomiast, podwyższony poziom mRNA w mięśniu może być konsekwencją występowania przepukliny. Wiąże to się z inną funkcją genu *MMP13*. Gen ten odgrywa kluczową rolę w procesie gojenia ran (Amar i in., 2017) oraz procesach regeneracyjnych i naprawczych (Toriseva i in., 2012; Lei i in., 2013). Dodatkowo, cytokiny i czynniki wzrostu powstające w warunkach patologicznych indukują ekspresję *MMP13* (Vincenti i in., 2002). Dlatego stwierdzono, że podwyższony poziom *MMP13* jest efektem uszkodzenia tkanki mięśniowej przez powstanie przepukliny pępkowej.

W przypadku genu *VIT*, Souza i in. (2020) stwierdzili jego obniżoną ekspresję u świń dotkniętych badaną wadą. W niniejszej pracy obserwowano natomiast podwyższony poziom mRNA tego genu w grupie zwierząt z przepukliną. Statystycznie istotne wyniki otrzymano tylko dla tkanki mięśniowej. Białko kodowane przez *VIT* zawiera dwie domeny von Willebrand A i jest składnikiem macierzy pozakomórkowej. Podobnie jak inne białka zawierające tę domenę (Colombatti i in., 1993; Whittaker i Hynes, 2002), prawdopodobnie odgrywa ono rolę w procesach migracji i adhezji komórek. Sugeruje to,

że obserwowany podwyższony poziom transkryptu w mięśniach jest efektem, a nie przyczyną przepukliny pępkowej, analogicznie do zaobserwowanych zmian w ekspresji *MMP13* w tej samej tkance.

W przypadku genów *ACAN* i *COL6A5* nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w poziomach mRNA dla obu analizowanych tkanek.

Dodatkowo, w celu identyfikacji potencjalnych mechanizmów regulujących różnice w ekspresji genów *MMP13* i *VIT* przeprowadzono analizę poziomu metylacji. Ze względu na ograniczoną ilość prób tkanki łącznej analiza ta została przeprowadzona tylko dla tkanki mięśniowej. Wykazano, że poziom metylacji jednej cytozyny, w regionie 5'UTR genu *MMP13*, był istotnie podwyższony u zwierząt dotkniętych przepukliną. Region ten jest istotny dla prawidłowej inicjacji translacji (Barrett i in., 2012), dodatkowo podczas rozwoju zarodkowego u ludzi niski poziom metylacji w regionie 5'UTR jest negatywnie skorelowany z ekspresją genów (Luo i in., 2018). Jednak brak istotnej korelacji między zaobserwowaną różnicą w metylacji cytozyny a ekspresją *MMP13* nie pozwala jednoznacznie stwierdzić, że zmiany w metylacji regionu 5'UTR mają istotny wpływ na rozwój przepukliny. W przypadku genu *VIT*, żadna z analizowanych cytozyn nie wykazała istotnych różnic w poziomie metylacji.

Dodatkową częścią drugiej pracy własnej była analiza poziomu ekspresji w tkankach świń z przepukliną pachwinową. Oba typy przepuklin mają podobny obraz kliniczny (Rodrigues i in., 2021) dlatego możliwe jest, że te same geny związane są z rozwojem obu wad. Analiza czterech grup zwierząt wykazała istotny wynik dla genu *ACAN*. Zaobserwowano znaczące różnice w poziomie mRNA tego genu pomiędzy grupami młodych osobników z przepukliną, z przepukliną, która uległa regresji oraz osobników bez przepukliny a grupą dojrzałych zwierząt z przepukliną. Bazując na funkcji genu jaką jest istotna rola w funkcjonowaniu tkanek chrzęstnych (Roughley i Mort, 2014) oraz w rozwoju szkieletu (Aspberg, 2012), zasugerowano, że obserwowany obniżony poziom mRNA u dorosłych osobników jest efektem starzenia się organizmu a nie jest związany z przepukliną pępkową. Dla pozostałych badanych genów nie stwierdzono istotnych różnic w poziomie transkryptów.

8.3 Kompleksowa analiza genetycznego podłoża przepukliny pępkowej świń: analiza transkryptomoczną i epigenomiczną

Dotychczasowe badania nad molekularnym podłożem przepuklin pępkowych świń opierały się na szerokim wachlarzu metod, co doprowadziło do wytypowania kilku genów oraz szlaków biologicznych potencjalnie związanych z tą wadą. Wraz z rozwojem technologii, w tym sekwencjonowania RNA, możliwe stało się dokładniejsze śledzenie zmian ekspresji genów. Niemniej, mechanizmy molekularne prowadzące do powstawania przepuklin pozostają nie w pełni poznane. Dodatkową trudność stanowi złożona etiologia tej wady, uwarunkowana wielogenowo oraz prawdopodobnie predyspozycje rasowe, co ogranicza skuteczność selekcji genetycznej opartej na pojedynczych markerach.

Biorąc pod uwagę powyższe, w trzeciej pracy własnej zastosowano wieloaspektowe podejście obejmujące badania transkryptomoczną i epigenomiczną. Głównym celem było zidentyfikowanie genów o istotnie zmienionej ekspresji. Dodatkowo przeprowadzono analizę wzbogacenia ścieżek sygnałowych oraz identyfikację wariantów genetycznych i modyfikacji epigenetycznych, które mogą odpowiadać za obserwowane różnice w poziomach transkryptów. Warto podkreślić, że było to pierwsze tkankowo-specyficzne badanie koncentrujące się na analizie transkryptomoczną tkanki mięśniowej pobranej od świń z przepukliną pępkową oraz zdrowych osobników. Tkanka ta odgrywa kluczową rolę w patogenezie wady – osłabienie mięśni brzucha może prowadzić do rozwoju przepukliny (Doijode, 2019; Coste i in., 2024). Dlatego też analiza ukierunkowana na tę tkankę dostarcza unikalnych informacji na temat procesów biologicznych i szlaków molekularnych zaangażowanych w rozwój oraz integralność mięśni. Takie podejście może ujawnić mechanizmy niedostępne przy badaniu materiału będącego mieszaniną różnych tkanek.

Analiza RNA-seq wykazała istnienie 59 genów różniących się istotnie ekspresją pomiędzy grupą kontrolną a badaną. Wyniki zweryfikowano na większej stawce zwierząt techniką PCR w czasie rzeczywistym. Do analizy wybrano najbardziej interesujące geny, bazując na ich skorygowanej wartości p , logarytmie przy podstawie 2 ze zmiany względnej, funkcji oraz obecności genów w istotnym procesie biologicznym. Ostatecznie wyniki istotne statystycznie otrzymano dla 8 genów : *ALX1*, *EYA2*, *HOXA7*, *METTL21C*, *PITX1*, *PVALB*, *SIMI* i *TBX1*. Geny te zostały już wcześniej opisane w literaturze gdzie

większość z nich pełni istotną rolę w tkance mięśniowej. Następnie w celu identyfikacji potencjalnych przyczyn obserwowanych różnic w poziomach mRNA wykonano analizę na obecność SNP w regionach 5'-flankujących oraz badanie poziomu metylacji regionów regulatorowych.

Gen *ALXI*, dla którego zaobserwowano obniżoną ekspresję w grupie badanej, pełni ważną rolę w rozwoju struktur czaszkowo-twarzowych (Dee i in., 2013), jednak nie został wcześniej powiązany z funkcjonowaniem mięśni. Analiza pirosekwencjonowania wykryła jednakże obniżony poziom metylacji w regionie 5'-flankującym dwóch cytozyn, gdzie obniżony poziom zazwyczaj związany jest z podwyższoną ekspresją. Podobnie w przypadku *EYA2*, który należy do rodziny odgrywającej istotną rolę w rozwoju licznych narządów i tkanek, w tym mięśni (Soni i in., 2021), charakteryzował się obniżoną ekspresją jak również obniżoną metylacją. Jednakże należy zaznaczyć, że nie wykazano korelacji pomiędzy poziomem metylacji a transkrypcją dla *ALXI* i *EYA2*. Gen *SIMI* choć znany głównie z funkcji jaką pełni w rozwoju ośrodkowego układu nerwowego, pełni również rolę w migracji progenitorowych komórek mięśniowych u myszy i drobiu (Coumailleau i Duprez, 2009). Niniejsze badanie wykazało podwyższony poziom jego transkrypcji w grupie badanej w porównaniu do kontroli, jednakże poziom metylacji był również podwyższony. Tak niespodziewane wyniki dla trzech powyższych genów wskazują, że muszą istnieć inne mechanizmy regulacji odpowiadające za obserwowane różnice w poziomach mRNA aniżeli metylacja ich regionów regulatorowych. Gen *HOXA7* należy do rodziny Hox, białka do niej należące odgrywają kluczową rolę na różnych etapach rozwoju mięśni, u różnych gatunków (Poliacikova i in., 2021). W analizie RNA-seq jak i PCR w czasie rzeczywistym zaobserwowano podwyższoną ekspresję *HOXA7* u świń z przepukliną. Co więcej w wyniku pirosekwencjonowania konwertowanego fragmentu regulatorowego tego genu wykryto obniżoną metylację DNA, z negatywną korelacją w stosunku do poziomu mRNA, co może tłumaczyć podwyższony poziom ekspresji. Analogiczny wynik otrzymano dla genu *METTL21C*, co może sugerować, że obserwowana podwyższona ekspresja jest spowodowana przez czynniki epigenetyczne. Gen *METTL21C* jest zaangażowany w metylację reszt lizynowych w białkach, w tym w tkance mięśniowej (Wiederstein i in., 2018). Gen ten jest także kluczowy dla wytrzymałości i długotrwałej aktywności mięśni (Ke i in., 2023). Obserwowane zaburzenia jego ekspresji mogą prowadzić do upośledzonej metylacji innych białek, a tym samym przyczyniać się do zaburzeń w obrębie tkanki mięśniowej

oraz rozwoju przepukliny pępkowej. Podobnie jak w przypadku *HOXA7* i *METTL21C*, gen *PITX1* wykazał podwyższony poziom ekspresji i obniżony stopień metylacji. Gen ten odpowiada za regulację ekspresji genów zaangażowanych w rozwój mięśni, a jego dysfunkcja może prowadzić do nieprawidłowości w ich strukturze (Duboc i Logan, 2011; Szeto i in., 1999). Jednakże test Spearmana nie wykazał na występowanie istotnej korelacji. Odpowiedzialny za regulację liczby miocytów oraz rozwój mięśni (Dastjerdi i in., 2007) gen *TBX1* został już wcześniej opisany jako mający związek z przepukliną pachwinową ludzi (Zhang i in., 2013). W niniejszej analizie została zaobserwowana istotna różnica w poziomie jego transkryptu (obniżona ekspresja u świń z przepukliną), która istotnie korelowała z obserwowaną podwyższoną metylacją. Dla genu *PVALB*, który jest związany ze wzrostem mięśni u świń (Ayuso i in., 2016), wykryto istotnie zwiększony poziom transkryptu w grupie badanej jednak żadna z analizowanych cytozyn nie różniła się istotnie pod względem metylacji.

Analiza wzbogacenia ścieżek sygnałowych wykazała obecność 60 znaczących procesów biologicznych oraz 16 istotnych funkcji molekularnych, w które zaangażowane były geny o zmienionym poziomie mRNA. Procesy te są powiązane z podstawowymi funkcjami komórkowymi i szlakami, co uwiadamia odmienny wzór ekspresji genów pomiędzy grupą UH a grupą kontrolną. Analiza GO wykazała istotne zaangażowanie genów związanych z procesami potencjalnie powiązanymi z rozwojem przepukliny pępkowej, takimi jak morfogeneza układu szkieletowego (GO:0001501, GO:0048704 oraz GO:0048705). Wiadomo, że rozwój układu szkieletowego obejmuje również formowanie mięśni, a te oba typy tkanek rozwijają się w sposób skoordynowany (Pineault i Wellik, 2014). Co więcej, niektórzy badacze sugerują, że tkanka kostna może wpływać na metabolizm mięśni szkieletowych — zarówno bezpośrednio, jak i pośrednio. Uzyskane wyniki sugerują, że zakłócenia w tych szlakach mogą przyczyniać się do osłabienia struktury mięśni oraz tkanek łącznych w okolicy pępka (Cianferotti i Brandi, 2014), co zwiększa ryzyko rozwoju przepukliny. Warto podkreślić, że wśród genów zidentyfikowanych w ramach tych procesów, geny *ALX1* oraz *HOXA7* wykazały istotność statystyczną w weryfikacji metodą PCR w czasie rzeczywistym, przeprowadzonej na większej liczbie próbek. Inne istotne szlaki GO, które mogą być związane z rozwojem przepukliny pępkowej, obejmują procesy związane z rozwojem narządów zarodkowych oraz morfogenezą (GO:0048568, GO:0048598, GO:0048562, GO:0009790, GO:0043009), w których udział biorą również geny *HOXA7* i *ALX1*, a

także *TBX1*. W trakcie rozwoju zarodkowego pewne defekty lub nieprawidłowości morfologiczne mogą potencjalnie prowadzić do powstawania przepuklin. W szczególności, z uwagi na złożoną strukturę tworzącą się w okresie rozwoju zarodkowego, pępek pozostaje szczególnie podatnym obszarem w budowie ciała, co wiąże się z ryzykiem wystąpienia przepukliny w późniejszym okresie życia (Conze i in., 2007).

Badanie od kątem identyfikacji polimorfizmów w regionach 5'-flankujących wykryło szereg wariantów SNP. Jeden wariant w genie *METTL21C* (rs330073569) wykazał wyższą częstość allelu T u zwierząt z przepukliną w porównaniu do grupy kontrolnej. Allel ten może to potencjalnie zmieniać siłę wiązania czynników transkrypcyjnych, a tym samym mieć wpływ na obserwowaną różnicę w ekspresji genu zwłaszcza, że w analizie *in silico* wykazano obecność sekwencji o charakterze promotora w regionie gdzie występuje ten polimorfizm. W przypadku wariantu C, czynniki transkrypcyjne takie jak STAT4 i E2F-1 mogą wiązać się z tym miejscem. Zmiana nukleotydu na T prowadzi do utraty miejsca wiązania dla E2F-1, a jednocześnie wzmacnia dopasowanie dla STAT4 i wprowadza nowe miejsce wiązania dla TFII-I. STAT4 jest aktywatorem transkrypcji (Kaplan, 2005), a jego większe dopasowanie do miejsca w regionie promotorowym może prowadzić do podwyższonej ekspresji genu co zostało zaobserwowane zarówno w wynikach z analizy RNA-seq jak i na późniejszym etapie weryfikacji metodą PCR w czasie rzeczywistym. Dodatkowo nowe miejsce wiązania dla TFII-I, będącego kofaktorem transkrypcji (Roy, 2012), może tłumaczyć obserwowane różnice w poziomie transkryptu dla *METTL21C*. W przypadku E2F-1 (jest on przede wszystkim znany jako aktywator transkrypcji), obserwowana podwyższona ekspresja genu *METTL21C* w przypadku utraty wiązania E2F-1 z promotorem dla allelu T może być związana z obecnością innych czynników transkrypcyjnych (takich jak STAT4 i TFII-I), które mogą kompensować lub nawet wzmacniać aktywność transkrypcyjną.

Analiza skierowana na wykrycie polimorfizmów CNV w badanych genach przy wykorzystaniu metody ddPCR wykazała dwie kopie dla wszystkich badanych genów w obu grupach świń. Sugeruje to, że CNV nie są przyczyną zmienionego poziomu transkryptów tych genów. Jak dotąd tylko w przypadku jednego genu (*NUGGC*) wskazywano na związek zmienności liczby kopii z występowaniem przepukliny pępkowej świń rasy duroc (Long i in., 2016).

Podobnie analiza poziomu białka z wykorzystaniem techniki western blot nie wykazała istotnych różnic między zwierzętami z przepukliną a grupą kontrolną. Należy jednak zaznaczyć, że analiza została przeprowadzona na ograniczonej liczbie białek (ze względu na problemy związane ze specyficznością przeciwciał dla świń) i niewielkiej grupie zwierząt. Co więcej stabilność cząsteczek mRNA odgrywa istotną rolę w regulacji potranskrypcyjnej, wskazując, że zmiany w ekspresji genów (mRNA) nie zawsze skutkują zmianą w syntezie białek (Wu i Brewer, 2012). Okres półtrwania mRNA, regulowany przez białka wiążące RNA oraz mikroRNA, może wpływać na ilość i trwałość transkryptu w komórce. Tego typu mechanizmy mogą leżeć u podstaw obserwowanych w niniejszym badaniu rozbieżności między poziomem mRNA a poziomem białka.

Warianty SNP w obrębie genów *GALNT16*, *PAOX*, *RFTN1* i *SLC9A1* zostały poddane analizie metodą Sanger na większej stawce zwierząt. Geny te zostały wybrane ze względu na rolę kodowanych przez nie białek w funkcjonowaniu tkanki mięśniowej. *GALNT16*, bierze udział procesie glikozylacji będącym kluczowym dla prawidłowej fizjologii mięśni (Martin-Rendon i Blake, 2003). *PAOX* koduje acetylopoliaminooksydazę uczestniczącą w katabolizmie sperminy (Ivanova i in., 2024), której nagromadzenie zaobserwowano w hipertrofii, natomiast obniżone poziomy były związane z atrofią mięśni (Lee i MacLean, 2011). *RFTN1* odgrywa rolę w sygnalizacji komórek układu odpornościowego (Deng i in., 2022) co może hipotetycznie wpływać na funkcję mięśni w kontekście chorób autoimmunologicznych. *SLC9A1* odpowiada za regulację wewnątrzkomórkowego pH. Spadek jego ekspresji może prowadzić do zakwaszenia, co z kolei może wpływać na wrażliwość miofilamentów na jony Ca^{2+} (Salem i in., 2012). Analiza na większej stawce zwierząt, wykrytych polimorfizmów w RNA-seq (wytypowane warianty: rs341151132 w *GALNT16*, rs690269483 w *PAOX*, rs334837422 w *RFTN1* i rs318378401 w *SLC9A1*) nie wykazała jednak istnienia istotnych statystycznie różnic w częstości alleli pomiędzy grupą zdrowych osobników a zwierzętami z przepukliną.

9. Podsumowanie dyskusji i wnioski

Identyfikacja markerów genetycznych ma kluczowe znaczenie w badaniach nad uwarunkowaniem przepuklin pępkowych świń. Lepsze zrozumienie mechanizmów dziedziczenia oraz przyczyn występowania tej wady może mieć istotne znaczenie dla praktyki hodowlanej oraz gospodarki. Zidentyfikowane markery mogłyby zostać wykorzystane do selekcji i eliminacji z populacji niepożądanych wariantów genów związanych z występowaniem przepukliny pępkowej. Takie podejście może prowadzić do poprawy dobrostanu zwierząt i ograniczenia strat ekonomicznych. Nie bez znaczenia są również zmiany epigenetyczne. Mogą one być odpowiedzialne ze obserwowane różnice w ekspresji genów (Nowacka-Woszek, 2021).

W etiologii przepukliny pępkowej możemy wskazać zarówno czynniki genetyczne jak i środowiskowe. Zakażenia, otyłość, zabiegi weterynaryjne czy urazy fizyczne mogą sprzyjać rozwojowi tej wady (Savoldi i in., 2021). Wiedza na temat czynników poza genetycznych związanych z przepukliną może pozwolić na lepsze dostosowanie warunków środowiskowych, takich jak odpowiednia higiena, zarządzanie i opieka weterynaryjna, co może pomóc w ograniczeniu ryzyka wystąpienia tej wady.

Poza wymienionym pozytywnymi aspektami badań w sferze ekonomicznej i etycznej należy zaznaczyć użyteczność tych wyników w badaniach dotyczących innych zwierząt gospodarskich jak i ludzi. Przepuklina pępkowa jest problemem, który nie ogranicza się tylko do gatunku *sus scrofa*. Występowanie tej wady stanowi również problem wśród owiec czy bydła, gdzie również komponent genetyczny ma wpływ na jej rozwój (Amare i Haben, 2020). Zidentyfikowane, potencjalne markery genetyczne mogą być użyteczne w przypadku innych gatunków gospodarczych. U ludzi przepuklina stanowi problem pediatryczny, ale także dotyka dorosłych. Czynniki takie jak otyłości, silny kaszel, liczne ciążę czy podnoszenia ciężarów mogą prowadzić do wystąpienia wady (Nowacka-Woszek, 2021). Mając na uwadze, że świnia jest zwierzęciem modelowym dla ludzi, ze względu na podobny rozmiar, fizjologię i morfologię (Goh i in., 2018), otrzymane wyniki mogą mieć zastosowanie w lepszym zrozumieniu i zapobieganiu postawiania przepukliny u ludzi.

Podsumowując, uzyskane wyniki własne świadczą o złożoności zaburzenia, jakim jest przepuklina pępkowa. Poszerzają one również wiedzę na temat mechanizmów

molekularnych biorących udział w jej rozwoju, a także typują nowe, dotychczas nie wskazane markery genetyczne i epigenetyczne, które mogą mieć związek z jej powstawaniem.

W pierwszym eksperymencie, badając wskazane we wcześniejszych pracach warianty SNP i CNV związane z występowaniem przepuklin pępkowej, na większej grupie zwierząt o innym komponencie genetycznym wykazano:

- 1) istotne różnice w częstości alleli dla SNP w genie *CAPN9* tylko dla panelu 1 co sugeruje, że częstości wariantów DNA związanych z przepukliną pępkową może być konsekwencją odmiennych pul genowych w analizowanych grupach zwierząt
- 2) istotny związek haplotypów w genach *ITGAM* oraz *OSM* w panelu 2 z ryzykiem wystąpienia przepukliny co sugeruje, że określone kombinacje wariantów genetycznych w tych genach mogą predysponować do wystąpienia tej wady
- 3) istotną interakcję między haplotypem w *CAPN9*, a płcią w panelu 2 co sugeruje, że czynniki hormonalne mogą modulować wpływ tej kombinacji wariantów genetycznych na ryzyko wystąpienia przepukliny

W drugim eksperymencie, analizując różnice w ekspresji transkryptów w różnych typach tkanek, dla genów wskazanych we wcześniejszych pracach, na większej grupie zwierząt i o innym komponencie genetycznym stwierdzono, że:

- 1) podwyższona ekspresja *MMP13* w tkance mięśniowej oraz obniżona w tkance łącznej u świń z UH wskazuje na różnice w regulacji tego genu w porównaniu do wyników Souza i in. (2020). Może to wynikać z odmiennych metodologii, w tym nieuwzględnienia różnic między tkankami w poprzednim badaniu, lub z innej puli genetycznej badanych populacji
- 2) obniżony poziom transkryptu *MMP13* w tkance łącznej może przyczyniać się do osłabienia struktury tej tkanki i predysponować do UH, podczas gdy podwyższona ekspresja w mięśniu może być efektem uszkodzenia tkanki
- 3) podwyższona ekspresja genu *VIT* w tkance mięśniowej jest sprzeczna z wcześniejszymi wynikami Souza i in. (2020), gdzie ekspresja była obniżona. Może to wynikać z tych samych czynników, które wpłynęły na różnice w ekspresji *MMP13*
- 4) podwyższony poziom mRNA genu *VIT* w mięśniu może być konsekwencją UH, podobnie jak w przypadku *MMP13*

- 5) brak istotnych różnic w ekspresji genów *ACAN* i *COL6A5* w tkance mięśniowej oraz łącznej sugeruje, że nie odgrywają one kluczowej roli w patogenezie UH, w przypadku badanych mieszańców
- 6) istotnie wyższy poziom metylacji jednej cytozyny w regionie 5'UTR genu *MMP13* u świń z UH może wskazywać na potencjalne mechanizmy epigenetyczne wpływające na jego ekspresję, jednak brak korelacji nie pozwala jednoznacznie stwierdzić, że obserwowanie zmiany w metylacji mają istotny wpływ na rozwój przepukliny
- 7) brak istotnych różnic w poziomie metylacji genu *VIT* sugeruje, że jego regulacja nie jest zależna od zmian epigenetycznych w analizowanym regionie
- 8) istotne różnice w ekspresji między młodymi osobnikami z przepukliną pachwinową, osobnikami z regresją przepukliny pachwinowej oraz osobnikami zdrowymi a grupą dorosłych osobników z przepukliną pachwinową mogą wynikać ze starzenia organizmu, a nie być związane z badaną wadą
- 9) brak istotnych wyników dla genów *MMP13*, *VIT* i *COL6A5* w kontekście przepukliny pachwinowej sugeruje, że nie odgrywają one istotnej roli w jej patogenezie w przypadku badanej stawki zwierząt

W trzecim eksperymencie, badając poziom ekspresji genów uzyskanych przy wykorzystaniu sekwencjonowania RNA tkanki mięśniowej oraz czynniki genetyczne i epigenetyczne mogące wpływać na różnice w poziomie mRNA wykazano:

- 1) że podwyższona ekspresja genów *SIMI*, *METTL21C*, *PITXI* i *HOXA7* oraz obniżona ekspresja *TBX1*, *EYA2*, *ALX1* i *PVALB* w grupie badanej wskazuje na potencjalną rolę w patogenezie przepuklin u badanych mieszańców
- 2) istotne różnice w metylacji cytozyn dla genów *HOXA7*, *METTL21C* oraz *TBX1* co wskazuje na potencjalny wpływ epigenetycznych mechanizmów regulujących poziom transkryptów
- 3) że brak istotnych różnic w metylacji cytozyn dla genu *PVALB*, istotnej korelacji wyników dla *PITXI* oraz brak zgodności pomiędzy różnicami w metylacji *EYA2*, *ALX1* oraz *SIMI* a poziomami ich ekspresji może sugerować istnienie bardziej złożonego mechanizmu regulacyjnego dla tych genów
- 4) wyższa częstość allelu T u zwierząt z przepukliną dla wariantu rs330073569 w potencjalnym promotorze genu *METTL21C* może wpływać na przyłączanie się czynników transkrypcyjnych, co może regulować ekspresję tego genu

- 5) brak istotnych różnic we frekwencjach alleli dla pozostałych analizowanych genów sugeruje, że inne czynniki mogą mieć większy wpływ na rozwój UH niż badane warianty SNP
- 6) występowanie dwóch kopii każdego analizowanego genu potwierdza brak strukturalnych delecji lub duplikacji
- 7) brak różnic w poziomie białek dla analizowanej ograniczonej liczby białek sugeruje, że zmiany na poziomie transkryptu mogą nie przekładać się bezpośrednio na poziom białka
- 8) brak istotnych różnic w częstości alleli dla wytypowanych na podstawie analizy RNA-seq wariantów SNP pomiędzy grupami wskazuje, że badane polimorfizmy nie mają bezpośredniego wpływu na podatność na UH

Na podstawie wyników uzyskanych w badaniu dodatkowym wykazano, że:

- 1) istnienie związku z występowaniem przepukliny u osobników z panelu 2 a polimorfizmem rs335136145 w genie *MYO19* oraz brak takiej zależności u zwierząt pochodzących od mieszańców z panelu 1, może wskazywać na specyficzny związek tego wariantu tylko dla zwierząt o określonej puli genowej
- 2) brak statystycznie istotnych różnic w częstości alleli pomiędzy grupami z przepukliną a osobnikami kontrolnymi dla badanych wariantów w genach *MYH2*, *MYH8*, *ZNF646* i *ZNF713* w obu analizowanych panelach zwierząt sugeruje, że nie odgrywają one kluczowej roli w predyspozycji do przepukliny w tej populacji

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że przepuklina pępkowa świń jest wadą o złożonej etiologii, a czynniki genetyczne zaangażowane w jej powstawanie mogą różnić się w zależności od rasy i populacji. Dodatkowo udało się potwierdzić część wyników uzyskanych we wcześniejszych pracach dla zwierząt z inną pulą genetyczną, co wzmacnia ich wiarygodność. Podsumowując całość niniejszej pracy można stwierdzić, że:

- 1) w zależności od udziału różnych ras w puli genowej badanych mieszańców wskazano na warianty DNA które predysponują do wystąpienia przepukliny pępkowej świń
- 2) istnieją geny, których zmieniona ekspresja u świń z przepukliną, może uczestniczyć w etiologii tej wady

- 3) istnieją czynniki epigenetyczne (metylacja DNA) uczestniczące w patogenezie przepuklin pępkowych świń
- 4) po raz pierwszy wykonano analizę wyłącznie dla tkanki mięśniowej wypreparowanej z pierścienia pępkowego, co stanowi istotny wkład w zrozumienie molekularnych podstaw tej wady rozwojowej świń

Biorąc powyższe pod uwagę, nadal wiele aspektów dotyczących występowania przepukliny pępkowej świń wymaga dalszych badań, w tym analiz na poziomie białka. Kolejne prace powinny uwzględnić zwierzęta o odmiennym profilu genetycznym, aby precyzyjniej wytypować markery specyficzne dla poszczególnych ras i populacji. Pozwoli to na opracowanie skutecznych testów selekcyjnych, wspierających programy hodowlane i zmniejszających częstość występowania tej wady w populacji, tym samym redukując koszty ponoszone przez hodowców jak i poprawiając dobrostan zwierząt.

10. Literatura

1. Anaya, J. M., Kim-Howard, X., Prahalad, S., Chernavsky, A., Cañas, C., Rojas-Villarraga, A., Bohnsack, J., Jonsson, R., Bolstad, A. I., Brun, J. G., Cobb, B., Moser, K. L., James, J. A., Harley, J. B., & Nath, S. K. (2012). Evaluation of genetic association between an ITGAM non-synonymous SNP (rs1143679) and multiple autoimmune diseases. *Autoimmunity reviews*, 11(4), 276–280. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2011.07.007>
2. Amar, S., Smith, L., & Fields, G. B. (2017). Matrix metalloproteinase collagenolysis in health and disease. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*, 1864(11 Pt A), 1940–1951. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.04.015>
3. Amare, E., & Haben, F. (2020). Hernias in farm animals and its management technique: A review. *International Journal of Clinical Studies and Medical Case Reports*, 4(4). <https://doi.org/10.46998/IJCMCR.2020.04.000091>
4. Aspberg A. (2012). The different roles of aggrecan interaction domains. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 60(12), 987–996. <https://doi.org/10.1369/0022155412464376>
5. Atkinson, M., Amezcua, R., DeLay, J., Widowski, T., & Friendship, R. (2017). Evaluation of the effect of umbilical hernias on play behaviors in growing pigs. *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne*, 58(10), 1065–1072.
6. Ayuso, M., Fernández, A., Núñez, Y., Benítez, R., Isabel, B., Fernández, A. I., Rey, A. I., González-Bulnes, A., Medrano, J. F., Cánovas, Á., López-Bote, C. J., & Óvilo, C. (2016). Developmental Stage, Muscle and Genetic Type Modify Muscle Transcriptome in Pigs: Effects on Gene Expression and Regulatory Factors Involved in Growth and Metabolism. *PloS one*, 11(12), e0167858. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167858>
7. Barrett, L. W., Fletcher, S., & Wilton, S. D. (2012). Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 69(21), 3613–3634. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-0990-9>

8. Beasley, L. (2017). Umbilical hernia surgery in calves. *Livestock*, 22(4), 186–190. <https://doi.org/10.12968/live.2017.22.4.186>
9. Beighton, P. H., Murdoch, J. L., & Votteler, T. (1969). Gastrointestinal complications of the Ehlers-Danlos syndrome. *Gut*, 10(12), 1004–1008. <https://doi.org/10.1136/gut.10.12.1004>
10. Beuzen, N. D., Stear, M. J., & Chang, K. C. (2000). Molecular markers and their use in animal breeding. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 160(1), 42–52. <https://doi.org/10.1053/tvj.2000.0468>
11. Bracale, U., Peltrini, R., Iacone, B., Martirani, M., Sannino, D., Gargiulo, A., Corcione, F., Serra, R., & Bracale, U. M. (2023). A Systematic Review on the Role of Matrix Metalloproteinases in the Pathogenesis of Inguinal Hernias. *Biomolecules*, 13(7), 1123. <https://doi.org/10.3390/biom13071123>
12. Cianferotti, L., & Brandi, M. L. (2014). Muscle-bone interactions: basic and clinical aspects. *Endocrine*, 45(2), 165–177. <https://doi.org/10.1007/s12020-013-0026-8>
13. Charon, K.M., & Świtoński, M. (2012). *Genetyka i genomika zwierząt*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa. ISBN 978-83-01-17107-0.
14. Colombatti, A., Bonaldo, P., & Doliana, R. (1993). Type A modules: interacting domains found in several non-fibrillar collagens and in other extracellular matrix proteins. *Matrix (Stuttgart, Germany)*, 13(4), 297–306. [https://doi.org/10.1016/s0934-8832\(11\)80025-9](https://doi.org/10.1016/s0934-8832(11)80025-9)
15. Conze, J., Prescher, A., Schlächter, M., & Schumacher, O. (2007). The umbilical hernia. W V. Schumpelick & R. J. Fitzgibbons (Red.), *Recurrent hernia* (ss. 359–364). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-68988-1_35
16. Coste, A. H., Bamarni, S., & Leslie, S. W. (2024). Umbilical Hernia. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
17. Coumailleau, P., & Duprez, D. (2009). Sim1 and Sim2 expression during chick and mouse limb development. *The International journal of developmental biology*, 53(1), 149–157. <https://doi.org/10.1387/ijdb.082659pc>

18. Croxton, R., Ma, Y., Song, L., Haura, E. B., & Cress, W. D. (2002). Direct repression of the Mcl-1 promoter by E2F1. *Oncogene*, 21(9), 1359–1369. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205157>
19. Dagar, V., Hutchison, W., Muscat, A., Krishnan, A., Hoke, D., Buckle, A., Siswara, P., Amor, D. J., Mann, J., Pinner, J., Colley, A., Wilson, M., Sachdev, R., McGillivray, G., Edwards, M., Kirk, E., Collins, F., Jones, K., Taylor, J., Hayes, I., ... Algar, E. M. (2018). Genetic variation affecting DNA methylation and the human imprinting disorder, Beckwith-Wiedemann syndrome. *Clinical epigenetics*, 10(1), 114. <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0546-4>
20. Dastjerdi, A., Robson, L., Walker, R., Hadley, J., Zhang, Z., Rodriguez-Niedenführ, M., Ataliotis, P., Baldini, A., Scambler, P., & Francis-West, P. (2007). Tbx1 regulation of myogenic differentiation in the limb and cranial mesoderm. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 236(2), 353–363. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21010>
21. Davoli, R., & Braglia, S. (2007). Molecular approaches in pig breeding to improve meat quality. *Briefings in functional genomics & proteomics*, 6(4), 313–321. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elm036>
22. Dee, C. T., Szymoniuk, C. R., Mills, P. E., & Takahashi, T. (2013). Defective neural crest migration revealed by a Zebrafish model of Alx1-related frontonasal dysplasia. *Human molecular genetics*, 22(2), 239–251. <https://doi.org/10.1093/hmg/dd5423>
23. Deng, C., Zhang, L., Ma, X., Cai, S., Jia, Y., & Zhao, L. (2022). RFTN1 facilitates gastric cancer progression by modulating AKT/p38 signaling pathways. *Pathology, research and practice*, 234, 153902. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2022.153902>
24. Ding, N. S., Mao, H. R., Guo, Y. M., Ren, J., Xiao, S. J., Wu, G. Z., Shen, H. Q., Wu, L. H., Ruan, G. F., Brenig, B., & Huang, L. S. (2009). A genome-wide scan reveals candidate susceptibility loci for pig hernias in an intercross between White Duroc and Erhualian. *Journal of animal science*, 87(8), 2469–2474. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1601>
25. Distl, O., Herrmann, R., Utz, J., Doll, K., & Rosenberger, E. (2002). Inheritance of congenital umbilical hernia in German Fleckvieh. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 119(1), 25–30. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0388.2002.00346.x>

26. Doijode, V. (2019). Umbilical hernia in ruminant calves: A review. *The Pharma Innovation Journal*, 8(4), 164–167. <https://www.thepharmajournal.com>
27. Du, Z. Q., Zhao, X., Vukasinovic, N., Rodriguez, F., Clutter, A. C., & Rothschild, M. F. (2009). Association and haplotype analyses of positional candidate genes in five genomic regions linked to scrotal hernia in commercial pig lines. *PloS one*, 4(3), e4837. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004837>
28. Duboc, V., & Logan, M. P. (2011). *Pitx1* is necessary for normal initiation of hindlimb outgrowth through regulation of *Tbx4* expression and shapes hindlimb morphologies via targeted growth control. *Development (Cambridge, England)*, 138(24), 5301–5309. <https://doi.org/10.1242/dev.074153>
29. Franz M. G. (2006). The biology of hernias and the abdominal wall. *Hernia : the journal of hernias and abdominal wall surgery*, 10(6), 462–471. <https://doi.org/10.1007/s10029-006-0144-9>
30. Fordyce, A. L., Hines, E. A., Edwards, E. M., Plaengkaeo, S., Stalder, K. J., Colpoys, J. D., Bundy, J. M., Johnson, A. K., & Tyler, H. D. (2020). Measuring birth weight and umbilical cord diameter at birth to predict subsequent performance in swine. *Translational animal science*, 5(1), txaa214. <https://doi.org/10.1093/tas/txaa214>
31. Gatphayak, K., Charoensook, R., Taesoongnern, S., Laiprawat, S., Simasatikul, N., Apichartsrungkoon, T., Kumphakarm, R., Brenig, B., Knorr, C. (2007). Identification of porcine hernia inguinalis/scrotalis using single nucleotide polymorphism in *INSL3* and *BAX* genes. *Proceedings of the 2007 Tropentag; 2007 October 9–11; University of Kassel. Witzenhausen, Germany: Cuvillier Verlag Göttingen. 2007, p554.*
32. Główny Urząd Statystyczny. (2024, wrzesień 12). Pogłowie świń według stanu w czerwcu 2024 roku. Główny Urząd Statystyczny. <https://stat.gov.pl/obszary-tematyczne/rolnictwo-lesnictwo/produkcja-zwierzeca-zwierzeta-gospodarskie/poglowie-swin-wedlug-stanu-w-czerwcu-2024-roku%2C10%2C8.html>
33. Goh, C. S., Joethy, J. V., Tan, B. K., & Wong, M. (2018). Large animal models for long-segment tracheal reconstruction: a systematic review. *The Journal of surgical research*, 231, 140–153. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2018.05.025>
34. Gómez, Y., Stygar, A. H., Boumans, I. J. M. M., Bokkers, E. A. M., Pedersen, L. J., Niemi, J. K., Pastell, M., Manteca, X., & Llonch, P. (2021). A Systematic Review on

Validated Precision Livestock Farming Technologies for Pig Production and Its Potential to Assess Animal Welfare. *Frontiers in veterinary science*, 8, 660565. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.660565>

35. Grindflek, E., Hansen, M. H. S., Lien, S., & van Son, M. (2018). Genome-wide association study reveals a QTL and strong candidate genes for umbilical hernia in pigs on SSC14. *BMC genomics*, 19(1), 412. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4812-9>

36. Hata, S., Kitamura, F., Yamaguchi, M., Shitara, H., Murakami, M., & Sorimachi, H. (2016). A Gastrointestinal Calpain Complex, G-calpain, Is a Heterodimer of CAPN8 and CAPN9 Calpain Isoforms, Which Play Catalytic and Regulatory Roles, Respectively. *The Journal of biological chemistry*, 291(53), 27313–27322. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.763912>

37. Herrmann, R., Utz, J., Rosenberger, E., Doll, K., & Distl, O. (2001). Risk factors for congenital umbilical hernia in German Fleckvieh. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 162(3), 233–240. <https://doi.org/10.1053/tvj.2000.0567>

38. Ivanova, O. N., Gavlina, A. V., Karpenko, I. L., Zenov, M. A., Antseva, S. S., Zakirova, N. F., Valuev-Elliston, V. T., Krasnov, G. S., Fedyakina, I. T., Vorobyev, P. O., Bartosch, B., Kochetkov, S. N., Lipatova, A. V., Yanvarev, D. V., & Ivanov, A. V. (2024). Polyamine Catabolism Revisited: Acetylpolyamine Oxidase Plays a Minor Role due to Low Expression. *Cells*, 13(13), 1134. <https://doi.org/10.3390/cells13131134>

39. Kaplan M. H. (2005). STAT4: a critical regulator of inflammation in vivo. *Immunologic research*, 31(3), 231–242. <https://doi.org/10.1385/IR:31:3:231>

40. Ke, M., Yu, X., Sun, Y., Han, S., Wang, L., Zhang, T., Zeng, W., & Lu, H. (2023). Phosphorylated Adapter RNA Export Protein Is Methylated at Lys 381 by an Methyltransferase-like 21C (METTL21C). *International journal of molecular sciences*, 25(1), 145. <https://doi.org/10.3390/ijms25010145>

41. Khati, N. J., Enquist, E. G., & Javitt, M. C. (1998). Imaging of the umbilicus and periumbilical region. *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc*, 18(2), 413–431. <https://doi.org/10.1148/radiographics.18.2.9536487>

42. Kim, S., & Misra, A. (2007). SNP genotyping: technologies and biomedical applications. *Annual review of biomedical engineering*, 9, 289–320. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.9.060906.152037>

43. Knorr, C., Täubert, H., Peters, U., & Brenig, B. (2004). Characterization of two SNPs (single nucleotide polymorphisms) in the porcine INSL3 gene and their exclusion as a common genetic basis of hernia inguinalis in pigs. *Biochemical genetics*, 42(1-2), 11–19. <https://doi.org/10.1023/b:bigi.0000012140.41292.a9>
44. Komisja Europejska. (2015). PIGENDEF: Pig Genetics Defects Project. CORDIS EU Research Results. <https://cordis.europa.eu/project/id/262247/reporting/pl>
45. Kulacoglu H. (2018). Umbilical Hernia Repair and Pregnancy: Before, during, after.... *Frontiers in surgery*, 5, 1. <https://doi.org/10.3389/fsurg.2018.00001>
46. Lago, L. V., Nery da Silva, A., Zanella, E. L., Groke Marques, M., Peixoto, J. O., da Silva, M. V. G. B., Ledur, M. C., & Zanella, R. (2018). Identification of Genetic Regions Associated with Scrotal Hernias in a Commercial Swine Herd. *Veterinary sciences*, 5(1), 15. <https://doi.org/10.3390/vetsci5010015>
47. Lee, N. K., & MacLean, H. E. (2011). Polyamines, androgens, and skeletal muscle hypertrophy. *Journal of cellular physiology*, 226(6), 1453–1460. <https://doi.org/10.1002/jcp.22569>
48. Lei, H., Leong, D., Smith, L. R., & Barton, E. R. (2013). Matrix metalloproteinase 13 is a new contributor to skeletal muscle regeneration and critical for myoblast migration. *American journal of physiology. Cell physiology*, 305(5), C529–C538. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00051.2013>
49. Li, X., Xu, P., Zhang, C., Sun, C., Li, X., Han, X., Li, M., & Qiao, R. (2019). Genome-wide association study identifies variants in the CAPN9 gene associated with umbilical hernia in pigs. *Animal genetics*, 50(2), 162–165. <https://doi.org/10.1111/age.12760>
50. Liao, X. J., Lia, L., Zhang, Z. Y., Long, Y., Yang, B., Ruan, G. R., Su, Y., Ai, H. S., Zhang, W. C., Deng, W. Y., Xiao, S. J., Ren, J., Ding, N. S., & Huang, L. S. (2015). Susceptibility loci for umbilical hernia in swine detected by genome-wide association. *Genetika*, 51(10), 1163–1170. <https://doi.org/10.7868/s0016675815100100>
51. Long, Y., Su, Y., Ai, H., Zhang, Z., Yang, B., Ruan, G., Xiao, S., Liao, X., Ren, J., Huang, L., & Ding, N. (2016). A genome-wide association study of copy number variations with umbilical hernia in swine. *Animal genetics*, 47(3), 298–305. <https://doi.org/10.1111/age.12402>

52. Luo, R., Bai, C., Yang, L., Zheng, Z., Su, G., Gao, G., Wei, Z., Zuo, Y., & Li, G. (2018). DNA methylation subpatterns at distinct regulatory regions in human early embryos. *Open biology*, 8(10), 180131. <https://doi.org/10.1098/rsob.180131>
53. Mao, J. R., & Bristow, J. (2001). The Ehlers-Danlos syndrome: on beyond collagens. *The Journal of clinical investigation*, 107(9), 1063–1069. <https://doi.org/10.1172/JCI12881>
54. Marguerat, S., & Bähler, J. (2010). RNA-seq: from technology to biology. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 67(4), 569–579. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0180-6>
55. Martin-Rendon, E., & Blake, D. J. (2003). Protein glycosylation in disease: new insights into the congenital muscular dystrophies. *Trends in pharmacological sciences*, 24(4), 178–183. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(03\)00050-6](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(03)00050-6)
56. Miranda-Duarte A. (2018). DNA Methylation in Osteoarthritis: Current Status and Therapeutic Implications. *The open rheumatology journal*, 12, 37–49. <https://doi.org/10.2174/1874312901812010037>
57. Munif, M. R., Masud, R. I., & Tasnim, S. (2024). Surgical repair of incarcerated umbilical hernia in a white German Spitz. *Bulletin of the National Research Centre*, 48, Article 48. <https://doi.org/10.1186/s42269-024-01202-5>
58. Nowacka-Woszek, J. (2021). The genetic background of hernia in pigs: A review. *Livestock Science*, 244, 104317. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104317>
59. Nova, R., & González-Schnake, F. (2014). Red meat animals. In M. Dikeman & C. Devine (Eds.), *Encyclopedia of Meat Sciences* (2nd ed., pp. 211–217). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384731-7.00027-1>
60. Park, G. (2015). Umbilical hernia in dogs. *WagWalking*. <https://wagwalking.com/condition/umbilical-hernia>
61. Petersen, H. H., Nielsen, E. O., Hassing, A. G., Ersbøll, A. K., & Nielsen, J. P. (2008). Prevalence of clinical signs of disease in Danish finisher pigs. *The Veterinary record*, 162(12), 377–382. <https://doi.org/10.1136/vr.162.12.377>

62. Pineault, K. M., & Welik, D. M. (2014). Hox genes and limb musculoskeletal development. *Current osteoporosis reports*, 12(4), 420–427. <https://doi.org/10.1007/s11914-014-0241-0>
63. Poliacikova, G., Maurel-Zaffran, C., Graba, Y., & Saurin, A. J. (2021). Hox Proteins in the Regulation of Muscle Development. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 731996. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.731996>
64. Rauw, W. M., Rydhmer, L., Kyriazakis, I., Øverland, M., Gilbert, H., Dekkers, J. C., Hermes, S., Bouquet, A., Gómez Izquierdo, E., Louveau, I., & Gomez-Raya, L. (2020). Prospects for sustainability of pig production in relation to climate change and novel feed resources. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(9), 3575–3586. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10338>
65. Robert, F., & Pelletier, J. (2018). Exploring the Impact of Single-Nucleotide Polymorphisms on Translation. *Frontiers in genetics*, 9, 507. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00507>
66. Rodrigues, A. F. G., Ibelli, A. M. G., Peixoto, J. O., Cantão, M. E., Oliveira, H. C., Savoldi, I. R., Souza, M. R., Mores, M. A. Z., Carreño, L. O. D., & Ledur, M. C. (2021). Genes and SNPs Involved with Scrotal and Umbilical Hernia in Pigs. *Genes*, 12(2), 166. <https://doi.org/10.3390/genes12020166>
67. Romano, G. S., Ibelli, A. M. G., Lorenzetti, W. R., Weber, T., Peixoto, J. O., Cantão, M. E., Mores, M. A. Z., Morés, N., Pedrosa, V. B., Coutinho, L. L., & Ledur, M. C. (2020). Inguinal Ring RNA Sequencing Reveals Downregulation of Muscular Genes Related to Scrotal Hernia in Pigs. *Genes*, 11(2), 117. <https://doi.org/10.3390/genes11020117>
68. Ron, M., Tager-Cohen, I., Feldmesser, E., Ezra, E., Kalay, D., Roe, B., Seroussi, E., & Weller, J. I. (2004). Bovine umbilical hernia maps to the centromeric end of Bos taurus autosome 8. *Animal genetics*, 35(6), 431–437. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2004.01196.x>
69. Roughley, P. J., & Mort, J. S. (2014). The role of aggrecan in normal and osteoarthritic cartilage. *Journal of experimental orthopaedics*, 1(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s40634-014-0008-7>

70. Roy A. L. (2012). Biochemistry and biology of the inducible multifunctional transcription factor TFII-I: 10 years later. *Gene*, 492(1), 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.10.030>
71. Rueger, J., & Tuana, B. S. (2011). The E2F pathway in cardiac development and disease. W G. K. Owens & M. S. Parmacek (Red.), *Genes and cardiovascular function* (ss. 29–41). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7207-1_4
72. Salem, K. A., Adrian, T. E., Qureshi, M. A., Parekh, K., Oz, M., & Howarth, F. C. (2012). Shortening and intracellular Ca²⁺ in ventricular myocytes and expression of genes encoding cardiac muscle proteins in early onset type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Experimental physiology*, 97(12), 1281–1291. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2012.066639>
73. Savoldi, I. R., Ibelli, A. M. G., Cantão, M. E., Peixoto, J. O., Pires, M. P., Mores, M. A. Z., Lagos, E. B., Lopes, J. S., Zanella, R., & Ledur, M. C. (2021). A joint analysis using exome and transcriptome data identifies candidate polymorphisms and genes involved with umbilical hernia in pigs. *BMC genomics*, 22(1), 818. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-08138-4>
74. Searcy-Bernal, R., Gardner, I. A., & Hird, D. W. (1994). Effects of and factors associated with umbilical hernias in a swine herd. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 204(10), 1660–1664.
75. Sevillano, C. A., Lopes, M. S., Harlizius, B., Hanenberg, E. H., Knol, E. F., & Bastiaansen, J. W. (2015). Genome-wide association study using deregressed breeding values for cryptorchidism and scrotal/inguinal hernia in two pig lines. *Genetics, selection, evolution : GSE*, 47(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s12711-015-0096-6>
76. Shankar, D. A., Itani, K. M. F., O'Brien, W., & Sanchez, V. (2017). Factors associated with long-term outcomes of umbilical hernia repair. *JAMA Surgery*, 152(5), E172459. <https://doi.org/10.1001/jamasurg.2016.5052>
77. Soni, U. K., Roychoudhury, K., & Hegde, R. S. (2021). The Eyes Absent proteins in development and in developmental disorders. *Biochemical Society transactions*, 49(3), 1397–1408. <https://doi.org/10.1042/BST20201302>
78. Souza, M. R., Ibelli, A. M. G., Savoldi, I. R., Cantão, M. E., Peixoto, J. O., Mores, M. A. Z., Lopes, J. S., Coutinho, L. L., & Ledur, M. C. (2020). Transcriptome analysis

identifies genes involved with the development of umbilical hernias in pigs. *PloS one*, 15(5), e0232542. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232542>

79. Spadola, F., Neve, V. C., Interlandi, C. D., Spadaro, A., Macrì, F., Iannelli, N. M., & Costa, G. L. (2022). Hernioplasty with Peritoneal Flap for the Surgical Treatment of Umbilical Hernia in Swine. *Animals : an open access journal from MDPI*, 12(23), 3240. <https://doi.org/10.3390/ani12233240>

80. Stawski, L., & Trojanowska, M. (2019). Oncostatin M and its role in fibrosis. *Connective tissue research*, 60(1), 40–49. <https://doi.org/10.1080/03008207.2018.1500558>

81. Straw, B., & Bates, R. O. (2009). Anatomical abnormalities in a group of finishing pigs: Prevalence and pig performance. *Journal of Swine Health and Production*, 17(1). <https://doi.org/10.54846/jshap/578>

82. Szeto, D. P., Rodriguez-Esteban, C., Ryan, A. K., O'Connell, S. M., Liu, F., Kioussi, C., Gleiberman, A. S., Izpisua-Belmonte, J. C., & Rosenfeld, M. G. (1999). Role of the Bicoid-related homeodomain factor Pitx1 in specifying hindlimb morphogenesis and pituitary development. *Genes & development*, 13(4), 484–494. <https://doi.org/10.1101/gad.13.4.484>

83. Thaller, G., Dempfle, L., & Hoeschele, I. (1996). Investigation of the inheritance of birth defects in swine by complex segregation analysis. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 113, 77–92. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0388.1996.tb00593.x>

84. Thorslund, C. A., Aaslyng, M. D., & Lassen, J. (2017). Perceived importance and responsibility for market-driven pig welfare: Literature review. *Meat science*, 125, 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.11.008>

85. Toriseva, M., Laato, M., Carpen, O., Ruohonen, S. T., Savontaus, E., Inada, M., Krane, S. M., & Kähäri, V. M. (2012). MMP-13 regulates growth of wound granulation tissue and modulates gene expression signatures involved in inflammation, proteolysis, and cell viability. *PloS one*, 7(8), e42596. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042596>

86. Troullioud Lucas, A. G., Bamarni, S., Panda, S. K., & Mendez, M. D. (2023). Pediatric Umbilical Hernia. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. Accessed April 30, 2025. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459294/>

87. Whittaker, C. A., & Hynes, R. O. (2002). Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Molecular biology of the cell*, 13(10), 3369–3387. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-05-0259>
88. Whitworth, K. M., Green, J. A., Redel, B. K., Geisert, R. D., Lee, K., Telugu, B. P., Wells, K. D., & Prather, R. S. (2022). Improvements in pig agriculture through gene editing. *CABI agriculture and bioscience*, 3(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s43170-022-00111-9>
89. Wiederstein, J. L., Nolte, H., Günther, S., Piller, T., Baraldo, M., Kostin, S., Bloch, W., Schindler, N., Sandri, M., Blaauw, B., Braun, T., Hölper, S., & Krüger, M. (2018). Skeletal Muscle-Specific Methyltransferase METTL21C Trimethylates p97 and Regulates Autophagy-Associated Protein Breakdown. *Cell reports*, 23(5), 1342–1356. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.136>
90. Williams D. F. (2023). The plasticity of biocompatibility. *Biomaterials*, 296, 122077. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2023.122077>
91. Woźniak, J., Loba, W., Iskrzak, P., Kujawa, K., Wojtczak, J., & Nowacka-Woszuik, J. (2021). Przepukliny świń – problem weterynaryjno-hodowlany. *Życie Weterynaryjne*, 96(6), 408–411.
92. Wu, X., & Brewer, G. (2012). The regulation of mRNA stability in mammalian cells: 2.0. *Gene*, 500(1), 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.03.021>
93. Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*, 3(7), RESEARCH0034. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>
94. Vignal, A., Milan, D., SanCristobal, M., & Eggen, A. (2002). A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics, selection, evolution : GSE*, 34(3), 275–305. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-34-3-275>
95. Vigneshwaran, S., Ramesh, V., Sivakumar, K. & Chinnamani, K. (2018). Surgical management of umbilical hernia in Large White Yorkshire piglet under general anesthesia. *Indian Veterinary Journal*, 95, 61–63.

96. Vincenti, M. P., & Brinckerhoff, C. E. (2002). Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. *Arthritis research*, 4(3), 157–164. <https://doi.org/10.1186/ar401>
97. Virtala, A. M., Mechor, G. D., Gröhn, Y. T., & Erb, H. N. (1996). The effect of calfhoo diseases on growth of female dairy calves during the first 3 months of life in New York State. *Journal of dairy science*, 79(6), 1040–1049. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76457-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76457-3)
98. Zhang, Y., Han, Q., Li, C., Li, W., Fan, H., Xing, Q., & Yan, B. (2014). Genetic analysis of the TBX1 gene promoter in indirect inguinal hernia. *Gene*, 535(2), 290–293. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.11.012>
99. Zhao, X., Du, Z. Q., Vukasinovic, N., Rodriguez, F., Clutter, A. C., & Rothschild, M. F. (2009). Association of HOXA10, ZFPM2, and MMP2 genes with scrotal hernias evaluated via biological candidate gene analyses in pigs. *American journal of veterinary research*, 70(8), 1006–1012. <https://doi.org/10.2460/ajvr.70.8.1006>
100. Zheng, H., Si, Z., Kasperk, R., Bhardwaj, R. S., Schumpelick, V., Klinge, U., & Klosterhalfen, B. (2002). Recurrent inguinal hernia: disease of the collagen matrix?. *World journal of surgery*, 26(4), 401–408. <https://doi.org/10.1007/s00268-001-0239-5>

11. Spis tabel i rycin

Tabele:

Tabela 1. Przegląd dotychczas wytypowanych genów kandydujących związanych z występowaniem przepukliny pępkowej u świń.

Tabela 2. Charakterystyka badanych fragmentów genów: *CAPN9*, *OSM* i *ITGAM*.

Tabela 3. Startery użyte w PCR w czasie rzeczywistym

Tabela 4. Startery użyte w pirosekwencjonowaniu.

Tabela 5. Startery użyte w sekwencjonowaniu regionów 5'-flankujących metodą Sanger.

Tabela 6. Startery użyte w analizie wariantów DNA zidentyfikowanych w RNA-seq.

Tabela 7. Startery użyte w analizie ddPCR.

Tabela 8. Startery użyte w analizie wariantów SNP wskazanych w publikacji Savoldi i in., 2021.

Tabela 9. Charakterystyka badanych fragmentów genów: *MYO19*, *MYH2*, *MYH8*, *ZNF646* i *ZNF713*.

Tabela 10. Zestawienie 31 genów wykazujących podwyższoną ekspresję w RNA-seq z $FDR < 0,05$ i $\log_2FC > 1$.

Tabela 11. Zestawienie 28 genów wykazujących obniżoną ekspresję w RNA-seq z $FDR < 0,05$ i $\log_2FC < -1$.

Tabela 12. Zestawienie zidentyfikowanych ścieżek dla 59 genów różniących się ekspresją.

Tabela 13. Podsumowanie wyników z analizy RNA-seq i PCR w czasie rzeczywistym.

Tabela 14. Współczynniki korelacji rang Spearmana między danymi z RNA-seq a wynikami PCR w czasie rzeczywistym.

Tabela 15. Miejsca CpG w analizowanych genach wraz z ich pozycjami genomowymi, kontekstem genowym, poziomem metylacji i kierunkiem ekspresji w PCR w czasie rzeczywistym.

Tabela 16. Współczynnikami korelacji rang Spearmana pomiędzy poziomem metylacji istotnych statystycznie miejsc CpG, a ekspresją genów z PCR w czasie rzeczywistym.

Tabela 17. Procent różnicy w dopasowaniu do sekwencji pomiędzy motywem a odpowiadającym mu czynnikiem transkrypcyjnym dla wariantu referencyjnego i alternatywnego w regionie potencjalnego promotora genu *METTL21C*.

Tabela 18. Częstości alleli rs341151132 w genie *GALNT16*, rs690269483 w genie *PAOX*, rs334837422 w genie *RFTN1* oraz rs318378401 w genie *SLC9A1*.

Tabela 19. Częstości alleli wraz z ilorazem szans i wartością p dla SNPs w genie *MYO19*, w panelu 2.

Tabela 20. Częstości alleli wraz z ilorazem szans i wartością p dla SNPs w genie *MYO19*, *ZNF646*, *ZNF646*, *MYH2*, *MYH8* i *ZNF713* w panelu 1.

Tabela 21. Częstości alleli wraz z ilorazem szans i wartością p dla SNPs w genie *ZNF646*, *ZNF646*, *MYH2*, *MYH8* i *ZNF713* w panelu 2.

Ryciny:

Rycina 1. Porównanie fenotypu zwierzęcia z przepukliną pępkową (lewe) i zdrowego osobnika (prawe) (zdjęcie – R. Niemyjski).

Rycina 2. Schemat budowy ściany brzucha i powstałej przepukliny pępkowej (na podstawie Williams D. F., 2023).

Rycina 3. Graficzne podsumowanie wyników eksperymentu 1.

Rycina 4. Graficzne podsumowanie wyników eksperymentu 2.

Rycina 5. Heatmapa dla 59 genów z $FDR < 0,05$ oraz $|\log_2FC| > 1$.

Rycina 6. Logarytm dziesiętny z względnych poziomów mRNA genów: *SIMI*, *PITXI*, *HOXA7*, *METTL21C*, *PVALB*, *ALX1*, *EYA2*, *TBX1*, *ALX4*, *OSR2* i *IRX5*, uzyskany od

świń z grupy UH (świnie z przepukliną) i C (kontrola). Pionowe czarne linie przecinające ramki przedstawiają mediany, a białe krzyżyki oznaczają wartości średnie. Linie poniżej i powyżej prostokątów wskazują odpowiednio wartości minimalne i maksymalne, natomiast czarne kropki umieszczone poniżej i powyżej ramek reprezentują wartości odstające.

Rycina 7. Średni procent metylacji DNA $\pm$ odchylenie standardowe w pozycjach CpG genów: *SIM1*, *PITX1*, *HOXA7*, *METTL21C*, *PVALB*, *ALX1*, *EYA2* i *TBX1* dla dwóch grup: UH (świnie z przepukliną-czerwone słupki) oraz C (kontrola-niebieskie słupki). Gwiazdki oznaczają istotność statystyczną różnic między grupą UH a kontrolną: p: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Rycina 8. Fragment sekwencji potencjalnego regionu promotora *METTL21C* z zaznaczonym SNP (oba warianty), miejscami wiązania czynników transkrypcyjnych, odpowiadającymi im czynnikami transkrypcyjnymi oraz schematycznym przedstawieniem niższego poziomu metylacji (szare kółka) czterech cytozyn w przypadkach UH w porównaniu do grupy kontrolnej (czarne kółka).

Rycina 9. Identyfikacja 2 kopii genu *HOXA7* u trzech osobników z grupy UH oraz trzech zwierząt z grupy kontrolnej metodą ddPCR. NC: kontrola negatywna (brak DNA), UH: świnie z przepukliną, C: kontrole. Słupki błędów przedstawiają 95% przedział ufności.

Rycina 10. Poziom białek u zwierząt z grupy UH (świnie z przepukliną) i C (kontrola) – wyniki analizy western blot dla badanych białek względem GAPDH (białko referencyjne) oraz względna ekspresja w analizowanych grupach. A – wyniki dla *SIM1*, B – wyniki dla *PITX1*, C – wyniki dla *EYA2*, D – wyniki dla *TBX1*. Pionowe czarne linie przecinające ramki przedstawiają mediany, białe krzyżyki oznaczają wartości średnie. Linie poniżej i powyżej prostokątów wskazują odpowiednio wartości maksymalne i minimalne, natomiast czarne kropki umieszczone poniżej i powyżej ramek reprezentują wartości odstające.

Rycina 11. Graficzne podsumowanie wyników eksperymentu 3.

Rycina 12. Graficzne podsumowanie wyników eksperymentu dodatkowego.

RESEARCH ARTICLE

ANIMAL GENETICS WILEY

A confirmed association between DNA variants in *CAPN9*, *OSM*, and *ITGAM* candidate genes and the risk of umbilical hernia in pigs

J. Wozniak¹ | W. Loba¹ | P. Iskrzak² | M. Pszczola¹ | J. Wojtczak³ |
M. Switonski¹  | J. Nowacka-Woszuk¹

¹Department of Genetics and Animal Breeding, Poznan University of Life Sciences, Poznan, Poland

²AgriPlus, LLC, Poznan, Poland

³Department of Animal Breeding and Product Quality Assessment, Poznan University of Life Sciences, Suchy Las, Poland

Correspondence

J. Nowacka-Woszuk, Department of Genetics and Animal Breeding, Poznan University of Life Sciences, Wolynska 33, 60-637 Poznan, Poland.

Email: joanna.nowacka-woszuk@up.poznan.pl

Funding information

Narodowe Centrum Nauki, Grant/Award Number: 2019/33/B/NZ9/00654

Abstract

Umbilical hernia (UH) is one of the most prevalent defects of swine, affecting their welfare and causing considerable economic loss. The molecular mechanisms behind UH in pigs remain poorly understood. The aim of this study was to verify the association between UH and previously reported DNA variants in the *CAPN9*, *OSM*, *ITGAM*, and *NUGGC* genes. A case/control study design was applied in two different crossbred cohorts of commercial fatteners containing 412 and 171 pigs, respectively. SNPs within *CAPN9*, *OSM*, and *ITGAM* were analyzed using Sanger sequencing, and 10 SNPs in *CAPN9*, five in *OSM*, and two in *ITGAM* were identified. A structural variant in the *NUGGC* gene was studied by droplet-digital PCR, and an elevated copy number was detected in only a single individual. Significant differences in allele frequencies for four SNPs in *CAPN9* were detected. The haplotype analysis showed the effect on the risk of UH for two genes. The CAGGA haplotype within *OSM* and AT haplotype in *ITGAM* reduced the relative risk of UH by 52% and 45%, respectively, confirming that variants in those genes are associated with the risk of UH in pigs. Moreover, the interaction between the *CAPN9* haplotype and the sex of animals had also significant impact on UH risk.

KEY WORDS

CNV, haplotype, pig, SNP, structural variant, swine, umbilical hernia

INTRODUCTION

Hernias are a serious health problem in the swine industry and production system. They are one of the most common developmental disorders (Lago et al., 2018; Li et al., 2019), which together with splay leg, inguinal/scrotal hernia, and atresia lead to significant economic losses of about one hundred million US dollars annually in world production, taking into account only the mortality rate (Walters, 2016). Pigs with hernias have retarded growth due to feeding problems. The condition is thus responsible for reducing the value of the carcasses. Increases in the morbidity and mortality of the animals are also observed (Ding et al., 2009). Moreover, umbilical

hernias (UHs) are economically disadvantageous and significantly reduce the animals' welfare, causing discomfort and even pain (Rodrigues et al., 2021). The frequency of UH is estimated between 0.4% and 1.2% (Petersen et al., 2008; Searcy-Bernal et al., 1994; Straw et al., 2009) and varies by breed, farm, and production system (Sobestiansky & Carvalho, 2007).

The muscles around the navel are believed to play an important role in the formation of these hernias. A weakness in these muscles prevents the navel opening from closing correctly, allowing the contents of the abdominal cavity to protrude through the natural body wall. This involves the risk of hernia incarceration. Hernias are polygenic disorders with a significant contribution

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2023 The Authors. *Animal Genetics* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of Stichting International Foundation for Animal Genetics.

of nonhereditary factors, such as nutrition, physical injuries, infections, and excessive pressure in the abdomen (Grindflek et al., 2018; Souza et al., 2020). Heritability for UH in different populations oscillates around 0.25 (Thaller et al., 1996).

The mode of inheritance and the molecular mechanism responsible for the development of UH in pigs remain poorly understood. A genome-wide association study (GWAS) in Norwegian Landrace pigs indicated a highly significant quantitative trait locus in chromosome 14 (SSC14) associated with UH. Detailed analysis of this region revealed a cluster of associated single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the oncostatin M (*OSM*) and leukemia inhibitory factor (*LIF*) genes. The encoded proteins belong to the interleukin-6 family, which plays a role in cell differentiation, growth promotion, and inflammatory response to injury (Grindflek et al., 2018). A subsequent GWAS performed in an Erhualian × Shaziling F2 intercross population indicated a candidate SNP synonymous variant in the calpain-9 (*CAPN9*) gene, which is also located in SSC14 (Li et al., 2019). In a recent study of hernias in the Landrace breed, performed using RNA sequencing, a candidate SNP was described in the integrin α M (*ITGAM*) gene, which is involved in ectodermal cell differentiation (Rodrigues et al., 2021). This variant was also indicated by the same research group (Savoldi et al., 2021) using the exomic data. There has also been report on the association between copy number variant (CNV) and UH. Long et al. (2016) adopted the GWAS results to search for candidate CNVs in three different pig breeds (Duroc, Landrace, and Yorkshire). A single CNV located within nuclear GTPase (*NUGGC*) gene in SSC14 in Duroc breed was identified as highly associated with UH. It is known that this gene is involved in hepatoblastoma Beckwith–Wiedemann syndrome in humans, in which inguinal hernia is an accompanying syndrome (Long et al., 2016).

Taking the above into consideration, the aim of this study was to verify the potential association between previously indicated DNA variants within the *CAPN9*, *OSM*, *ITGAM*, and *NUGGC* genes and UH in two local cohorts of pigs with different breed gene pools.

MATERIALS AND METHODS

Animals, phenotypes, and samples collection

This study included two different cohorts of pigs (panels 1 and 2). The animals were derived from two commercial breeding farms located in Wielkopolska Province, Poland. The pigs were classified into case and control groups by the veterinarians who performed the sampling. During sample collection (Spring 2020), animals were approx. 3–4 months old and weight approx. 50–70 kg (fattening phase). The animals derived from the same contemporary group.

The pigs in panel 1 ($n = 412$) originated from a cross between a DunBred (Landrace × Yorkshire) maternal hybrid line and Landrace or Duroc paternal lines. Blood samples were collected from 362 pigs as part of routine veterinary procedures. Additionally, testicle samples were taken from 50 control males during routine castration. Umbilical hernia (case group) was diagnosed in 212 pigs, while the control group consisted of 200 unaffected animals. The case group contained 93 males and 119 females, while the control group had 118 males and 82 females.

Panel 2 consisted of 171 pigs; skin tissue fragments were collected from the ear during standard tagging procedure. 86 pigs in this panel had a UH, and 85 were controls. The UH group consisted of 43 males and 43 females, and there were 38 males and 47 females in the control. These pigs were the offspring of a cross between a maternal Camborough+ hybrid line (itself a cross of Large White and Duroc) and a paternal PIC337 line (a cross between British Large White and Pietrain).

DNA extraction

Genomic DNA was extracted from porcine blood using a Blood Mini kit (A&A Biotechnology). DNA was isolated from skin and testicular tissue using a Genomic Mini kit (A&A Biotechnology). All extractions were performed in line with the manufacturer's instructions. All DNA samples for Sanger sequencing were diluted to a final concentration of 25 ng/ μ L. The genetic material used in droplet-digital PCR (ddPCR) analysis was diluted to 10 ng/ μ L. The quantity and quality of total DNA were determined using a NanoDrop ND-2000 spectrophotometer (Thermo Scientific) using 260/280 nm wavelength readings. The DNA samples with the 260/280 ratio of 1.8–2.0 (Nanodrop reading) were used for downstream analysis.

PCR amplification

The genomic regions indicated in previous publications were analyzed using polymerase chain reaction: (1) fragment (chr14:59603379–59604090) containing single SNP (rs321865883) in exon 10 of *CAPN9* (Li et al., 2019); (2) region (chr14:47243686–47244307) of exon 3 and intron 3 of the *OSM* gene (Grindflek et al., 2018); and (3) SNP (rs327289001) in exon 2 of *ITGAM* (chr3:17254038–17254595) (Rodrigues et al., 2021). PCR primers were designed using Primer3Plus software (<https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>; Table S1) based on pig genome sequence: Sscrofa11.1. The PCR reactions were performed using Biometra thermocycler (Biometra, Germany) with a final volume of 20 μ L containing 1 U of Taq DNA Polymerase (EURx), reaction buffer B (10 $\times$, EURx), forward and reverse primers

(5 nM each), mix of ultrapure dNTPs (1.25 nM each, EURx), water, and DNA (10 ng). PCR conditions were: initial denaturation at 95°C for 5 min; 35 cycles of denaturation at 95°C for 40 s, primers annealing at 61°C for *OSM*; at 57°C for *CAPN9*; and at 60°C for *ITGAM* for 40 s and elongation at 72°C for 40 s, followed by a final extension at 72°C for 10 min. Also, the negative control samples (without DNA template) were included in each reaction. The amplicon lengths were checked on 1.5% agarose gel electrophoresis, with visualization on Chemi Doc MP Imagine System (Bio-Rad).

DNA sanger sequencing analysis

PCR products were purified with alkaline phosphatase and exonuclease (Thermo Fisher Scientific) and the sequencing reaction was carried out using BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Life Technologies) according to manufacturer's instructions. After amplification, the products were filtrated using Sephadex G50 (Sigma). Capillary electrophoresis was performed on a Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems) or Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems). The results of sequencing were checked in terms of quality and analyzed in SeqMan software from DNASTAR package (DNASTAR). The obtained sequences were compared to the GenBank reference sequences: *CAPN9* (GenBank ID: 100154688), *OSM* (GenBank ID: 100152038), and *ITGAM* (GenBank ID: 397459) to search for potential differences with the reference genome (Sscrofa11.1) following variants frequency comparison between studied groups.

Copy number variation analysis

Copy number variation was analyzed using ddPCR. The assay for *NUGGC* gene fragment amplification was designed on positions 14:11811750–14:11811889, with assay ID dCNS190470547 (Bio-Rad). The coagulation factor II gene (*F2*) was chosen as the reference gene (Floren et al., 2015, Table S1). All procedures were performed in line with the manufacturer's instructions. Briefly, to prepare the PCR mixture, we mixed an *NUGGC* assay (the probe was FAM-labelled), DNA, ddPCR Supermix, an *EcoRI* restriction enzyme, primers, the probe for the reference gene (HEX-labelled), and water. Using a QX200 droplet generator (Bio-Rad), PCR mixtures were divided into about 20000 droplets. The samples were then amplified by emulsion PCR on a Gradient T100 Thermal Cycler (Bio-Rad) under the following conditions: denaturation at 95°C for 10 min; 40 cycles at 94°C for 30 s and 58°C for 60 s (ramp rate 2°C/s); 98°C for 10 min, and 15°C until reading time. After that, a number of DNA copies were detected on a QX200 droplet reader (Bio-Rad). The results were analyzed with QuantaSoft software version 1.7.4.0917 (Bio-Rad). The number of copies was calculated using the

Poisson distribution with QuantaSoft Software (Bio-Rad) according to two copies of the reference gene (*F2*). The MedCalc Software online platform (https://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php) was used for the odds ratio test.

Statistical analysis

To determine significant differences between allele frequencies for SNPs in *CAPN9*, *OSM* and *ITGAM* comparing UH and controls, an odds ratio test was performed using the MedCalc Software online platform (https://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php). To account for multiple comparisons, the obtained *p*-values were adjusted using Benjamini and Hochberg (1995) method. The adjustment was performed for each panel separately (i.e., each for 17 comparisons). Further statistical analysis was performed in the R statistical environment (version 4.1.0) (R Core Team, 2021). Hardy–Weinberg equilibrium analysis was carried out using the SNPassoc package (version 2.0–2) *setupSNP* function.

Haplotype inference was performed using the *haplo.stats* package (version 1.8.7) (Sinnwell & Schaid, 2021). To assess the effect of haplotype and sex interaction, we performed a logistic regression analyses using *haplo.glm* function using the following model:

$$\ln\left(\frac{p}{1-p}\right) = \beta_0 + \beta_1 \text{haplotype} + \beta_2 \text{sex} + \beta_3 \text{haplotype} \times \text{sex} + e,$$

where *p* is the probability of UH positive case (0 = UH negative and 1 = UH positive), β_n are regression coefficients estimated on the data. The *haplotype* classes were constructed from the data using EM algorithm implemented within *haplo.glm* function. Haplotypes with the frequency lower than 5% are not shown in the results. The *sex* (0 = females and 1 = males) and $\times$, denotes interaction between haplotype and sex, *e* is the random residual term. The exponents of the model estimates are presented in the paper such that they can be interpreted as odds ratios. The next model to assess the effect of haplotype on the UH occurrence was the same as previous one but with the exclusion of haplotype $\times$ sex interaction. All the analyzed genes were tested separately in all panels. The sex effect was included in the model to account for the gender structure in the analyzed data.

RESULTS

Sanger sequencing

DNA sequencing analysis within *CAPN9* gene revealed a known candidate SNP (rs321865883) and other nine known SNPs (rs329326514, rs319812220, rs340675701,

rs328320041, rs336325720, rs327407895, rs333405922, rs344753123, rs334849732). In the *OSM* gene, we found five SNPs (rs325568366, rs345555467, rs338199923, rs80801201, rs343002186) within the tested sequence. In the *ITGAM* gene, in addition to the analyzed SNP (rs327289001), another SNP (rs341372952) was found.

Allele frequencies for SNPs in *CAPN9*, *OSM*, and *ITGAM*

We compared allele frequencies between animals that developed a UH and the control animals. These analyses were performed for *CAPN9*, *OSM*, and *ITGAM* genes. The association of SNPs from the *CAPN9*, *OSM*, and *ITGAM* genes with UH is shown as odds ratios. The frequency of four out of 10 identified SNPs within *CAPN9* differed significantly between the analyzed groups after adjusted for multiple comparisons, but only in panel 1 (Table 1). The allele frequencies for other variants in *CAPN9* and for all SNPs in *OSM* and *ITGAM* genes, did not differ significantly within both tested panels (Table S2). The genotype frequencies for all identified SNPs are shown in Table S3.

Additionally, we tested the Hardy–Weinberg equilibrium for all the identified SNPs. We detected that the majority of studied SNPs in both panels met this condition (Tables 1 and S2), with the exception of four SNPs (rs327407895, rs321865883, rs341372952, rs327289001) in panel 1 and one (rs341372952) in panel 2.

Haplotype analysis

The analysis of interaction between haplotypes and sex was performed for all the genes and within each panel. Only one significant interaction in panel 2 was found for *CAPN9* gene between CTCGCCCTTG haplotype and the sex ($p = 0.0421$), where the frequency of this haplotype for males and females was similar (0.2284 and 0.2166, respectively) – Table S4. In the analysis of haplotype effect (with the correction for sex) on the UH occurrence, we found interesting results only in panel 2. The haplotype CAGGA in *OSM* gene showed a significant effect on the UH ($p = 0.0147$) with an odds ratio of 0.52 indicating that animals with this haplotype had a 52% reduction in the relative risk of developing hernia, as compared to the most frequent TCAAG haplotype (Table 2). Also for *ITGAM* gene the AT haplotype decreased for 45% relative risk of UH in comparison for the most frequent AC haplotype ($p = 0.0234$) – Table 2.

Droplet-digital PCR analysis

Droplet-digital PCR analysis was performed for 340 animals, including 160 cases and 90 controls from panel 1,

TABLE 1 Allele frequencies with odds ratio and Hardy–Weinberg p -value for significant variants in at least one panel.

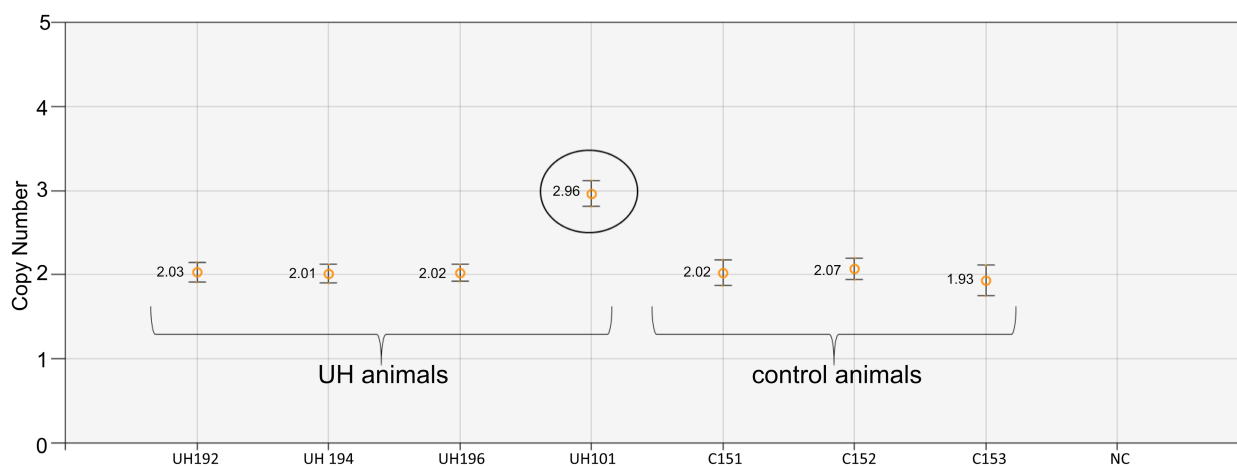
Gene	Variant (rs ID) and genomic localization	Amino acid variation	Allele	Panel 1				Panel 2			
				Frequency		Hardy–Weinberg p	Odds ratio	Frequency		Hardy–Weinberg p	Odds ratio
				UH	CON			UH	CON		
<i>CAPN9</i>	rs340675701 Ref:T>Alt:C 14:59603851	intron variant	T	0.479	0.570	0.0089	0.046*	0.651	0.694	0.3976	1.2157
			C	0.521	0.430			0.349	0.306		
	rs336325720 Ref:T>Alt:C 14:59603779	intron variant	T	0.481	0.570	0.0108	0.046*	0.651	0.682	0.5408	1.1508
			C	0.519	0.430			0.349	0.318		
	rs333405922 Ref:T>Alt:C 14:59603757	intron variant	T	0.481	0.572	0.0088	0.046*	0.669	0.735	0.1784	1.3768
			C	0.519	0.428			0.331	0.265		
	rs344753123 Ref:T>Alt:C 14:59603708	intron variant	T	0.868	0.793	0.0041	0.046*	0.948	0.924	0.3655	0.6668
			C	0.132	0.207			0.052	0.076		
											>0.999

Abbreviations: Ref, reference allele variant; Alt, alternative allele variant; UH, umbilical hernia.

*Significant adjusted p -value.

TABLE 2 The effect of haplotype on the risk of umbilical hernia occurrence (with correction for sex).

Gene	Animals	Haplotype	Frequency of haplotype (male/female)	OR (CI) ^a	<i>p</i>
<i>OSM</i>	Panel 1	CAGGA	0.8823 (0.8910/0.8731)	1.00	Most frequent haplotype
		TCAAG	0.1177 (0.109/0.1269)	1.34 (0.85–2.11)	0.2058
		Sex		0.55 (0.37–0.81)	0.0026
	Panel 2	TCAAG	0.7193 (0.7161/0.7222)	1.00	Most frequent haplotype
		CAGGA	0.2719 (0.2779/0.2667)	0.52 (0.31–0.88)	0.0147*
		Sex		1.26 (0.68–2.33)	0.4596
<i>ITGAM</i>	Panel 1	AC	0.7803 (0.7915/0.7687)	1.00	Most frequent haplotype
		AT	0.0983 (0.0877/0.1095)	1.32 (0.79–2.21)	0.2913
		GC	0.1214 (0.1209/0.1219)	0.75 (0.47–1.21)	0.2412
		Sex		0.55 (0.37–0.81)	0.0026
	Panel 2	AC	0.7398 (0.7407/0.7389)	1.00	Most frequent haplotype
		AT	0.1228 (0.1358/0.1111)	0.45 (0.22–0.90)	0.0234*
		GC	0.1374 (0.1235/0.15)	0.87 (0.43–1.75)	0.7030
		Sex		1.28 (0.69–2.37)	0.4269
<i>CAPN9</i>	Panel 1	TCTCTCTTCG	0.3365 (0.3246/0.3511)	1.00	Most frequent haplotype
		CCCGCCCTTG	0.1768 (0.1713/0.1828)	1.01 (0.63–1.61)	0.9689
		CTCGCCCTTG	0.2782 (0.2766/0.2799)	1.19 (0.84–1.70)	0.3296
		TCTCTTTCCA	0.1528 (0.1628/0.1401)	0.67 (0.41–1.10)	0.1168
		Sex		0.54 (0.37–0.81)	0.0025
	Panel 2	TCTCTTTTCA	0.3002 (0.3456/0.2555)	1.00	Most frequent haplotype
		CCCGCCCTTG	0.0673 (0.0741/0.0611)	1.44 (0.55–3.73)	0.4558
		CTCGCCCTTG	0.2222 (0.2284/0.2166)	1.30 (0.70–2.40)	0.4070
		TCTCTCTTCG	0.2835 (0.2406/0.3277)	1.00 (0.54–1.87)	0.9904
		TCTCTTTCCA	0.0622 (0.0617/0.0611)	0.66 (0.24–1.79)	0.4146
		Sex		1.16 (0.62–2.17)	0.6434

^aOdds ratio with a confidence interval of 95%.*Significant *p*-value; haplotypes with the frequency <0.05 were not included in the analysis.FIGURE 1 Identification of three copies of *NUGGC* gene fragment by droplet-digital PCR—marked with a circle (in a single umbilical hernia [UH] animal). The animals are identified by their laboratory ID identifications (data not shown). NC, negative control (sample with no DNA template).

and 50 affected pigs and 40 healthy controls from panel 2. Two copies of the examined fragment of the *NUGGC* gene were found in both crossbred pig lines for all animals, with a single exception in panel 1, where a UH

animal had three copies of the analyzed fragment (Figure 1). The odds of presence of three copies of *NUGGC* gene were equal in the case and control groups (odds ratio = 0.59; *p* = 0.7454).

DISCUSSION

There have been previous attempts to find the genetic background of UH, which have included examining SNPs and CNVs as markers associated with this condition (Nowacka-Woszek, 2021). In the present case/control study, we examined the distribution of SNPs variants in *CAPN9*, *OSM*, and *ITGAM*, as well as CNV in the *NUGGC* gene. We also aimed to estimate the risk of UH in two different commercial pig lines in relation to haplotype as well as haplotype $\times$ sex interaction. Due to the study design, where the cohorts were not randomized, the sex was included in the statistical model only to adjust the data. Thus, we conclude only on haplotype effect and haplotype $\times$ sex interaction but not on the sex effect itself.

The genes we selected for analysis had been identified in previous reports as associated with UH. The study of Li et al. (2019) identified a synonymous variant (rs321865883) in exon 10 of the *CAPN9* gene in intercross Chinese pigs, but only in two UH individuals, compared to 43 relatives. This gene is expressed mainly in the gastrointestinal tract and encodes calpain-9 protein, which belongs to family of Ca^{2+} -dependent cysteine proteases responsible for essential biological functions (Hata et al., 2016; Li et al., 2019). For *CAPN9* in our large cohorts of pigs, we observed a significant interaction between sex and CTCGCCCTTG haplotype in panel 2.

An association between the polymorphisms of *OSM* and UH was reported by Grindflek et al. (2018), who used GWAS to study large groups of UH and control purebred Norwegian Landrace pigs. This gene encodes oncostatin M, which belongs to the IL-6 cytokine family and has many functions, such as inflammatory response, cell differentiation, and growth promotion (Grindflek et al., 2018; Stawski & Trojanowska, 2019). Our study confirmed that *OSM* variants are associated with UH indicating that the CAGGA haplotype decreased the risk of this disorder by 52%; however, this relationship was observed only in the pigs in panel 2, which represent a commercial line with a major proportion of Large White, Duroc, and Pietrain breeds. In the *ITGAM* gene, a missense variant (rs327289001, p.150Val>Met) was identified by RNA-seq analysis and was classified by in silico prediction as deleterious (Rodrigues et al., 2021). In our analysis, the AT haplotype (including the rs327289001 variant) significantly reduced UH risk by 45% in the pigs of panel 2, confirming its association with the development of this condition in pigs. The last gene we studied was *NUGGC*, which encodes a protein implicated in lymphomas and human hepatoblastoma Beckwith–Wiedemann syndrome, with which hernias can co-occur (Long et al., 2016). Our study did not show any association with the CNV of this gene, as was reported in Duroc pigs affected by UH (Long et al., 2016), since only in a single animal we observed three copies on *NUGGC* gene.

Genome scanning approaches have been used to seek the DNA variants associated with polygenic hernias, and it has been found that some candidate genomic regions (such as in porcine chromosomes 2 and 14) are associated with UH, but only in a breed-specific or line-specific manner (Ding et al., 2009; Grindflek et al., 2006; Grindflek et al., 2018; Li et al., 2019). Recently, studies of the molecular background of hernias have focused on gene transcription disturbance in the tissues involved in hernia development (umbilical ring). The RNA-seq approach has shown altered transcriptional profile for genes playing a role in extracellular matrix remodeling, as well as collagen production and its integrity and resistance. Of these, *ACAN*, *MMPs*, *COLs*, *EPYC*, *VIT*, *CCBE1*, and *LGALS3* have been indicated as candidates that deserve further investigation (Souza et al., 2020). The same research group later indicated DNA polymorphisms within new candidates (e.g., in genes responsible for myosin formation, muscle contraction, and skeletal muscle development) in the sequenced transcriptomes, which were potentially associated with UH in Landrace pigs (Savoldi et al., 2021). That analysis was performed on a very small group of UH vs. control animals, and the predicted effects of these variants for the encoded proteins was determined only by an in silico SIFT (sorting intolerant from tolerant) analysis. These results thus need to be validated in a larger group of affected and control pigs (Savoldi et al., 2021). Altered muscle and connective tissue development in the umbilical ring seems to be a crucial cause of hernias. Recently, a study of pigs with knockout of the myostatin gene (*MSTN*) showed a 50% or 19% UH occurrence in the homozygotes (*MSTN*^{-/-}) and heterozygotes (*MSTN*^{+/-}), respectively. The authors explained this observation with reference to the reduced level of collagen in the homozygote knockout pigs (Han et al., 2021).

In this study, we observed interaction between sex and haplotype in *CAPN9* gene. In human studies there is a report showing higher rate of UH in females, where the sex ratio for UH predominance is 3:1 (females vs. males) but no genomic data are included in this work (Coste et al., 2021). This can be explained by other risk factors, such as obesity and muscle weakness caused by multiple pregnancies. Such factors had not been studied in pigs, although it is known that breeds differ in terms of fatness traits. In our results, we observed the interaction between sex and haplotype in relation to UH occurrences, showing that the specific haplotype can reduce the risk of hernia but in relation to sex. One can suspect that sex differences in e.g. hormonal profile interacting with specific haplotype can have an impact on tissue formation or its endurance and thus influence on the risk of UH occurrence. Since limited data in pigs are available we can only speculate that there are some sex-specific genetic markers or sex-dependent phenotypic factors that predispose to this disorder, but to verify this statement, further investigation is needed.

CONCLUSION

Our study revealed that the frequencies of DNA variants associated with UH differed in the studied animal panels, which can be a consequence of different gene pools in this studied cohorts. The most pronounced association detected in our study concerned haplotypes of *OSM* and *ITGAM*, which significantly reduced the risk of UH development. We also showed sex and haplotype interaction for *CAPN9* indicating for its significant impact on the UH risk.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Konstancja Kujawa for her technical assistance.

FUNDING INFORMATION

This work was supported by the National Science Centre project, No. 2019/33/B/NZ9/00654.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare that there are no potential conflicts of interest associated with this research.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data supporting the findings of the present study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ETHICS STATEMENT

The samples were collected during routine veterinary procedures, which under Polish law does not require the permission of the local Bioethical Commission for Animal Care and Use in Poznan, Poland (13/01/2020).

ORCID

M. Switonski  <https://orcid.org/0000-0003-2539-9508>

REFERENCES

- Benjamini, Y. & Hochberg, Y. (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B*, 57, 289–300. Available from: <https://doi.org/10.2307/2346101>
- Coste, A.H., Jaafar, S. & Parmely, J.D. (2021) *Umbilical hernia*. StatPearls [internet]. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing.
- Ding, N., Mao, H., Guo, Y., Ren, J., Xiao, S., Wu, G. et al. (2009) A genome-wide scan reveals candidate susceptibility loci for pig hernias in an intercross between white Duroc and Erhualian. *Journal of Animal Science*, 87, 2469–2474. Available from: <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1601>
- Floren, C., Wiedemann, I., Brenign, B., Schütz, E. & Beck, J. (2015) Species identification and quantification in meat and meat products using droplet digital PCR (ddPCR). *Food Chemistry*, 173, 1054–1058. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.138>
- Grindflek, E., Moe, M., Taubert, H., Simianer, H., Lien, S. & Moen, T. (2006) Genome-wide linkage analysis of inguinal hernia in pigs using affected sib pairs. *BMC Genetics*, 7, 25. Available from: <https://doi.org/10.1186/1471-2156-7-25>
- Grindflek, E., Hansen, M.H.S., Lein, S. & Son, M. (2018) Genome-wide association study reveals a QTL and strong candidate genes for umbilical hernia in pigson SSC14. *BMC Genomics*, 19, 412. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4812-9>
- Han, S.Z., Li, Z.Y., Paek, H.J., Choe, H.M., Yin, X.J. & Quan, B.H. (2021) Reproduction traits of heterozygous myostatin knockout sows crossbred with homozygous myostatin knockout boars. *Reproduction in Domestic Animals*, 56, 26–33. Available from: <https://doi.org/10.1111/rda.13845>
- Hata, S., Kitamura, F., Yamaguchi, M., Shitara, H., Murakami, M. & Sorimachi, H.A. (2016) Gastrointestinal Calpain complex, G-calpain, is a heterodimer of CAPN8 and CAPN9 Calpain isoforms, which play catalytic and regulatory roles, respectively. *Journal of Biological Chemistry*, 291, 27313–27322. Available from: <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.763912>
- Lago, L.V., da Silva, A.N., Zanella, E.L., Marques, M.G., Peixoto, J.O., da Silva, M.V.G.B. et al. (2018) Identification of genetic regions associated with scrotal hernias in a commercial swine herd. *Veterinary Sciences*, 5, 15. Available from: <https://doi.org/10.3390/vetsci5010015>
- Li, X., Xu, P., Zhang, C., Sun, C., Li, X., Han, X. et al. (2019) Genome-wide association study identifies variants in the CAPN9 gene associated with umbilical hernia in pigs. *Animal Genetics*, 50, 162–165. Available from: <https://doi.org/10.1111/age.12760>
- Long, Y., Su, Y., Ai, H., Zhang, Z., Yang, B., Ruan, G. et al. (2016) A genome-wide association study of copy number variations with umbilical hernia in swine. *Animal Genetics*, 47, 298–305. Available from: <https://doi.org/10.1111/age.12402>
- Nowacka-Woszek, J. (2021) The genetic background of hernia in pigs: a review. *Livestock Science*, 244, 104317. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104317>
- Petersen, H.H., Nielsen, E., Hassing, A., Ersbøll, A.K. & Nielsen, J.P. (2008) Prevalence of clinical signs of disease in Danish finisher pigs. *Veterinary Record*, 162, 377–382. Available from: <https://doi.org/10.1136/vr.162.12.377>
- R Core Team. (2021) *R: a language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Available from: <https://www.R-project.org/>
- Rodrigues, A.F.G., Ibelli, A.M.G., Peixoto, J.O., Cantão, M.E., de Oliveira, H.C., Savoldi, I.R. et al. (2021) Genes and SNPs involved with scrotal and umbilical hernia in pigs. *Genes (Basel)*, 12, 166. Available from: <https://doi.org/10.3390/genes12020166>
- Savoldi, I.R., Ibelli, A.M.G., Cantão, M.E., Peixoto, J.O., Pires, M.P., Mores, M.A.Z. et al. (2021) A joint analysis using exome and transcriptome data identifies candidate polymorphisms and genes involved with umbilical hernia in pigs. *BMC Genomics*, 22, 818. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12864-021-08138-4>
- Searcy-Bernal, R., Gardner, I. & Hird, D. (1994) Effects of and factors associated with umbilical hernias in a swine herd. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 204, 1660–1664.
- Sinnwell, J.P. & Schaid, D.J. (2021) Haplo.Stats: statistical analysis of haplotypes with traits and covariates when linkage phase is ambiguous. R package version 1.8.7. <https://CRAN.R-project.org/package=haplo.stats>
- Sobestiansky, J. & Carvalho, L.F.O.S. (2007) Malformações. In: Sobestiansky, J. & Barcellos, D.J. (Eds.) *Doenças dos Suínos*. Goiânia, Brazil: Cãnone Editorial, pp. 527–538.
- Souza, M.R., Ibelli, A., Savoldi, I.R., Cantão, M.E., Peixoto, J.O., Mores, M. et al. (2020) Transcriptome analysis identifies genes involved with the development of umbilical hernias in pigs. *PLoS One*, 15, e0232542. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232542>
- Stawski, L. & Trojanowska, M. (2019) Oncostatin M and its role in fibrosis. *Connective Tissue Research*, 60, 40–49. Available from: <https://doi.org/10.1080/03008207.2018.1500558>
- Straw, B., Bates, R. & May, G. (2009) Anatomical abnormalities in a group of finishing pigs: prevalence and pig performance. *Journal of Swine Health and Production*, 17, 28–31.

- Thaller, G., Dempfle, L. & Hoeschele, I. (1996) Investigation of the inheritance of birth defects in swine by complex segregation analysis. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 113, 77–92. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0388.1996.tb00593.x>
- Walters, R. (2016) PigProgress—Genetic defects in pigs and how to deal with them. [cited March 29, 2020]. <https://www.pigprogress.net/pigs/genetic-defects-in-pigs-and-how-to-deal-with-them/>

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Wozniak, J., Loba, W., Iskrzak, P., Pszczola, M., Wojtczak, J., Switonski, M. et al. (2023) A confirmed association between DNA variants in *CAPN9*, *OSM*, and *ITGAM* candidate genes and the risk of umbilical hernia in pigs. *Animal Genetics*, 54, 307–314. Available from: <https://doi.org/10.1111/age.13307>

Supporting information

Table S1. Primers and probes used in Sanger sequencing and ddPCR.

Gene	Chromosome position	Primer sequence	Amplicon size
<i>CAPN9</i>	chr14:5960337 9-59604090	F: 5' CAGCTATGGGATGCTTGGTT 3' R: 5' GGGACTGGCTGCTGAATCT 3'	712 bp
<i>OSM</i>	chr14:4724368 6-47244307	F: 5' GACTGTCCTTTCTCCCCAGA 3' R: 5' CGGTGTCATCCTGCAGAGTA 3'	622 bp
<i>ITGAM</i>	chr3:17254038 -17254595	F: 5' CCACTTCTTGGCCAATCCT 3' R: 5' GGCAGGAGGGCTTTCTTAAC 3'	558 bp
<i>NUGGC</i>	Chr14	assay ID: dCNS190470547 (Bio-Rad)	63 bp
<i>F2</i>	chr2:15815638 -15815734	F: 5' CTGCCAGCGGGCTGGGAATA 3' R: 5' GGAGTTGACTCTGGAATAAGAAATTG 3' 5' HEX-CGCCCCCGCCCCCAGGGTCT-BQH1 3'	97 bp

Table S2. SNP variants identified in the studied gene (non-significant in allele frequencies).

Gene	Variant (rs ID) and genomic localization	Amino acid variation	Allele	Panel #1						Panel #2						
				Frequency		P-value	Adjusted P-value	Odd ratio	Hardy-Weinberg P-value	Frequency		P-value	Adjusted P-value	Odd ratio	Hardy-Weinberg P-value	
				UH	CON					UH	CON					
CAPN9	rs329326514 Ref:T>Alt:C 14:59603965	intron variant	T	0.488	0.572	0.0155	0.053	1.4039	0.9213	0.669	0.735	0.1784	0.303	1.3768	0.1468	
			C	0.512	0.428					0.331	0.265					
	rs321865883 Ref:A>Alt:G 14:59603502	p.416Leu>Leu	A	0.137	0.185	0.0602	0.114	1.4324	0.000760	0.355	0.400	0.3872	0.488	1.2131	0.870783	
			G	0.863	0.815					0.645	0.600					
	rs334849732 Ref:C>Alt:T 14:59603587	p.387Lys>Lys	C	0.486	0.553	0.0558	0.114	1.3066	0.692971	0.663	0.735	0.1447	0.303	1.4133	0.274875	
			T	0.514	0.447					0.337	0.265					
	rs327407895 Ref:T>Alt:C 14:59603768	intron variant	T	0.137	0.185	0.0602	0.114	1.4324	0.000760	0.366	0.382	0.7588	0.806	1.0711	0.624515	
			C	0.863	0.815					0.634	0.618					
	rs328320041 Ref:C>Alt:G 14:59603779	intron variant	C	0.507	0.573	0.0599	0.114	1.3018	0.767156	0.663	0.735	0.1447	0.303	1.4133	0.144769	
			G	0.493	0.427					0.337	0.265					
	rs319812220 Ref:C>Alt:T 14:59603851	intron variant	C	0.696	0.740	0.1590	0.189	1.2446	0.808259	0.750	0.788	0.4020	0.488	1.2407	0.088409	
			T	0.304	0.260					0.250	0.212					
	OSM	rs325568366 Ref:C>Alt:T 14:47244213	p.82Gly>Ser	C	0.868	0.897	0.1890	0.189	1.3324	0.096	0.221	0.341	0.0139	0.060	1.8261	0.7053
				T	0.132	0.103					0.779	0.659				
		rs345555467 Ref:C >Alt:A 14:47244187	p.90Arg>Arg	C	0.132	0.103	0.1890	0.189	0.7505	0.096	0.785	0.671	0.0182	0.060	0.5579	0.4385
				A	0.868	0.897					0.215	0.329				
rs80801201 Ref:G>Alt:A 14:47244133		p.108Thr>Thr	G	0.868	0.897	0.1890	0.189	1.3324	0.096	0.221	0.341	0.0139	0.060	1.8261	0.7053	
			A	0.132	0.103					0.779	0.659					
rs343002186 Ref:A>Alt:G 14:47243959	p.163Asp>Asp	A	0.868	0.897	0.1890	0.189	1.3324	0.096	0.215	0.329	0.0182	0.060	1.7923	0.4385		
		G	0.132	0.103					0.785	0.671						

ITGAM	rs338199923 Ref:A>Alt:G 14:47244172	p.95Thr> Thr	A	0.132	0.103	0.1890	0.189	0.7505	0.096	0.785	0.671	0.0182	0.060	0.5579	0.4385
			G	0.868	0.897					0.215	0.329				
	rs327289001 Ref:C>Alt:T 3:17254444	p.150Val> Met	C	0.887	0.917	0.1404	0.189	1.4197	0.0225	0.919	0.835	0.0212	0.060	0.4494	0.2878
			T	0.113	0.083					0.081	0.165				
	rs341372952 Ref:A>Alt:G 3:17254110	intron variant	A	0.894	0.862	0.1692	0.189	0.7448	0.001851	0.860	0.865	0.9093	0.909	1.0364	0.046666
			G	0.106	0.138					0.140	0.135				

Table S3. Genotype frequencies.

Gene	Variant (rs ID)	Genotype	Frequency			
			Panel #1		Panel #2	
			UH	CON	UH	CON
CAPN9	rs329326514	TT	0.245	0.320	0.407	0.529
		TC	0.486	0.505	0.523	0.412
		CC	0.269	0.175	0.070	0.059
	rs340675701*	TT	0.236	0.315	0.384	0.482
		TC	0.486	0.510	0.535	0.424
		CC	0.278	0.175	0.081	0.094
	rs336325720*	TT	0.236	0.315	0.384	0.459
		TC	0.490	0.510	0.535	0.447
		CC	0.274	0.175	0.081	0.094
	rs333405922*	TT	0.245	0.320	0.407	0.529
		TC	0.472	0.505	0.523	0.412
		CC	0.283	0.175	0.070	0.059
	rs344753123*	TT	0.736	0.615	0.895	0.847
		TC	0.264	0.355	0.105	0.153
		CC	0.000	0.030	0.000	0.000
	rs321865883	AA	0.000	0.010	0.093	0.200

OSM	rs334849732	AG	0.274	0.350	0.523	0.400
		GG	0.726	0.640	0.384	0.400
		CC	0.245	0.305	0.407	0.529
		CT	0.481	0.495	0.512	0.412
		TT	0.274	0.200	0.081	0.059
	rs327407895	TT	0.000	0.010	0.093	0.165
		TC	0.274	0.350	0.547	0.435
		CC	0.726	0.640	0.360	0.400
	rs328320041	CC	0.269	0.320	0.395	0.529
		CG	0.476	0.505	0.535	0.412
		GG	0.255	0.175	0.070	0.059
	rs319812220	CC	0.481	0.555	0.535	0.600
		CT	0.429	0.370	0.430	0.376
		TT	0.090	0.075	0.035	0.024
	rs325568366	CC	0.035	0.106	0.736	0.805
		CT	0.372	0.470	0.264	0.185
		TT	0.593	0.424	0.000	0.010
	rs345555467	CC	0.000	0.010	0.605	0.424
		CA	0.264	0.185	0.360	0.494
		AA	0.736	0.805	0.035	0.082

<i>ITGAM</i>	rs80801201	GG	0.736	0.805	0.035	0.106
		GA	0.264	0.185	0.372	0.470
		AA	0.000	0.010	0.593	0.424
	rs343002186	AA	0.736	0.805	0.035	0.082
		AG	0.264	0.185	0.360	0.494
		GG	0.000	0.010	0.605	0.424
	rs338199923	AA	0.000	0.010	0.605	0.424
		AG	0.264	0.185	0.360	0.494
		GG	0.736	0.805	0.035	0.082
	rs327289001	CC	0.774	0.835	0.837	0.718
		CT	0.226	0.165	0.163	0.235
		TT	0.000	0.000	0.000	0.047
	rs341372952	AA	0.788	0.725	0.721	0.729
		AG	0.212	0.275	0.279	0.271
		GG	0.000	0.000	0.000	0.000

* variants which differ significantly in allele frequencies in panel #1

Table S4. The effect of the sex × haplotype interaction on the risk of UH occurrence.

Gene	Animals	Haplotype	Frequency of haplotype (male/female)	OR (C.I.) ¹	P-value
OSM	Panel 1	CAGGA	0.8823 (0.891/0.8731)	1.00	Most frequent haplotype
		TCAAG	0.1177 (0.109/0.1269)	1.33 (0.71-2.49)	0.3799
		sex		0.54 (0.35-0.85)	0.0074
		sex × TCAAG ²		1.02 (0.41-2.54)	0.9605
	Panel 2	TCAAG	0.7193 (0.7161/0.7222)	1.00	Most frequent haplotype
		CAGGA	0.2719 (0.2779/0.2667)	0.44 (0.22-0.90)	0.0248
		sex		1.05 (0.4-2.42)	0.9020
		sex × CAGGA ²		1.49 (0.52-4.27)	0.4628
	Panel 1	AC	0.7803 (0.7915/0.7687)	1.00	Most frequent haplotype
		AT	0.0983 (0.0877/0.1095)	1.34 (0.65-2.76)	0.4330
		GC	0.1214 (0.1209/0.1219)	0.77 (0.39-1.52)	0.4527
		sex		0.56 (0.33-0.94)	0.0271
		sex × AT ²		0.98 (0.35-2.74)	0.9636
		sex × GC ²		0.95 (0.37-2.46)	0.9164
ITGAM	Panel 2	AC	0.7398 (0.7408/0.7389)	1.00	Most frequent haplotype
		AT	0.1228 (0.1358/0.1111)	0.48 (0.17-1.32)	0.1542
		GC	0.1374 (0.1235/0.15)	0.57 (0.22-1.46)	0.2415
		sex		1.00 (0.44-2.27)	0.9981
		sex × AT ²		0.92 (0.23-3.70)	0.9054
		sex × GC ²		2.69 (0.64-11.31)	0.1770
CAPN9	Panel 1	TCTCTCTTCG	0.3364 (0.3246/0.3511)	1.00	Most frequent haplotype

	CCCGCCCTTG	0.1767 (0.1713/0.1828)	0.90 (0.45-1.80)	0.7681
	CTCGCCCTTG	0.2782 (0.2766/0.2799)	1.49 (0.89-2.50)	0.1258
	TCTCTTTCCA	0.1529 (0.1628/0.1401)	0.73 (0.35-1.50)	0.3896
	sex		0.70 (0.27-1.77)	0.4491
	sex × CCCGCCCTTG ²		1.21 (0.47-3.09)	0.6926
	sex × CTCGCCCTTG ²		0.65 (0.32-1.32)	0.2328
	sex × TCTCTTTCCA ²		0.83 (0.30-2.25)	0.7077
Panel 2	TCTCTTTTCA	0.3003 (0.3456/0.2555)	1.00	Most frequent haplotype
	CCCGCCCTTG	0.0673 (0.0741/0.0611)	1.11 (0.28-4.34)	0.8813
	CTCGCCCTTG	0.2222 (0.2284/0.2166)	0.71 (0.31-1.64)	0.4229
	TCTCTCTTCG	0.2835 (0.2407/0.3277)	0.97 (0.43-2.19)	0.9467
	TCTCTTTCCA	0.0622 (0.0617/0.0611)	0.75 (0.19-2.92)	0.6770
	sex		0.68 (0.15-3.11)	0.6237
	sex × CCCGCCCTTG ²		1.54 (0.22- 10.78)	0.6652
	sex × CTCGCCCTTG ²		3.82 (1.05- 13.89)	0.0421*
	sex × TCTCTCTTCG ²		0.94 (0.26-3.47)	0.9302
	sex × TCTCTTTCCA ²		0.85 (0.11-6.46)	0.8713

¹ odds ratio with a confidence interval of 95%; ² the sex × haplotype interaction on UH; * the only one significant interaction; haplotypes with the frequency < 0.05 were not included in the analysis

Article

Altered Transcript Levels of *MMP13* and *VIT* Genes in the Muscle and Connective Tissue of Pigs with Umbilical Hernia

Jakub Wozniak ¹, Weronika Loba ¹, Alicja Wysocka ^{1,†}, Stanisław Dzimira ², Przemysław Prządka ³, Marek Switonski ¹ and Joanna Nowacka-Woszek ^{1,*}

¹ Department of Genetics and Animal Breeding, Poznań University of Life Sciences, Wolynska 33, 60-637 Poznań, Poland; jakub.wozniak@up.poznan.pl (J.W.); weronika.loba@up.poznan.pl (W.L.); alicja.wysocka@igcz.poznan.pl (A.W.); marek.switonski@up.poznan.pl (M.S.)

² Department of Pathology, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, C.K. Norwida 31, 50-375 Wrocław, Poland; stanislaw.dzimira@upwr.edu.pl

³ Department of Surgery, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Plac Grunwaldzki 51, 50-366 Wrocław, Poland; przemyslaw.przadka@upwr.edu.pl

* Correspondence: joanna.nowacka-woszek@up.poznan.pl; Tel.: +48-61-8487242

† Current address: Institute of Human Genetics, Polish Academy of Sciences, Strzeszynska 32, 60-479 Poznań, Poland.

Abstract: Umbilical hernia (UH) and inguinal hernia (IH) are among the most common defects in pigs, affecting their welfare and resulting in economic losses. In this study, we aimed to verify the association of previously reported differences in transcript levels of the *ACAN*, *COL6A5*, *MMP13*, and *VIT* genes with the occurrence of UH and IH. We examined mRNA levels in muscle and connective tissue from 68 animals—34 affected by UH and 34 controls. In a second cohort, we examined inguinal channel samples from 46 pigs (in four groups). We determined DNA methylation levels in muscle tissue for the UH and control animals. The transcript level of *MMP13* changed in the UH cases, being upregulated and downregulated in muscle and connective tissue, respectively, and the *VIT* gene also showed an increased muscular mRNA level. The transcript of the *ACAN* gene significantly decreased in old pigs with IH. We further observed an increased DNA methylation level for one CpG site within the *MMP13* gene in UH individuals. We conclude that these alterations in gene mRNA levels in the UH animals depend on the tissue and can sometimes be a consequence of, not a cause of, the affected phenotype.

Keywords: umbilical hernia; inguinal hernia; pig; DNA methylation; transcript level



Citation: Wozniak, J.; Loba, W.; Wysocka, A.; Dzimira, S.; Prządka, P.; Switonski, M.; Nowacka-Woszek, J. Altered Transcript Levels of *MMP13* and *VIT* Genes in the Muscle and Connective Tissue of Pigs with Umbilical Hernia. *Genes* **2023**, *14*, 1903. <https://doi.org/10.3390/genes14101903>

Academic Editors: Katarzyna Piórkowska and Katarzyna Ropka-Molik

Received: 1 September 2023

Revised: 27 September 2023

Accepted: 29 September 2023

Published: 1 October 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Global pig production continues to grow with the increasing human population. Live-stock provide many benefits such as employment growth, protein-rich food, and carbon storage [1], and the pig has become one of the most important livestock species [2]. The expanding pig industry needs to balance meat quality and animal welfare [3,4]. An important health issue in the pig industry is disorders like umbilical and inguinal hernia [5–7], which can result in economic losses.

Hernia is one of the most widespread condition in pigs; it involves the abdominal contents protruding and forming a subcutaneous bladder beneath the navel (umbilicus) [8], in the case of umbilical hernia (UH), or protruding via the inguinal canal in the case of inguinal hernia (IH) [9]. It can be affected by both genetic and environmental factors, such as incorrect cutting of the umbilical cord, high pressure in the abdomen, and infections and lesions of the body layers [7,10]. It is known that the occurrence of hernia ranges between 0.05% and 6.6%, depending on the breed and size of the studied cohorts. For example, the incidence of umbilical hernia in the Landrace and Pietrain breeds was reported to be 0.05% and 0.08%, respectively. For scrotal hernia, these estimations reached 2.4% for the Landrace

and 6.6% for the Yorkshire breed [11–13]. The heritability of this disorder is rather low at approximately 0.3 [14]. Affected animals often show retarded growth and reduced feed efficiency [5]. They also suffer from pain, which increases morbidity and mortality [15]. Hernia is thus a severe problem for both breeders and veterinarians [16].

Although several studies have focused on identifying the genetic markers associated with hernia (reviewed, e.g., by [16,17]), the molecular mechanism responsible for this disorder in pigs remains poorly understood [5,8,15,18,19]. Recent studies have used transcriptome analysis to highlight several genes as strong candidates which correlated with the occurrence of umbilical hernia [6]. The researchers used RNA-seq technology for umbilical ring tissue fragments in five healthy and five umbilical hernia pigs, identifying 230 differentially expressed genes. Some of these genes (*ACAN*, *VIT*, *LGALS3*, *EPYC*, *CCBE1*, as well as genes from the *COL* and *MMP* families) have been taken as key contributors, since they are involved in the remodeling of the extracellular matrix as well as in resistance, production, and integrity of collagen [6]. A similar study concerning scrotal hernia (a form of inguinal hernia) was also performed for the inguinal canal tissue collected from four affected and four normal pigs. This research uncovered 703 differentially expressed genes, and the *MAP1CL3C*, *MYBPC1*, *SLC8A3*, *FGF1*, *BOK*, *DES*, *TPM2*, and *SLC25A4* genes were indicated as crucial in hernia pathogenesis. These genes are involved in important processes such as cell differentiation, muscular system regulation, and myofibril assembly [20].

DNA methylation is one of the regulatory mechanisms which has an influence on gene expression. The effect of this epigenetic modification may vary depending on the location of methylated cytosines and the level of methylation itself. It was already reported that cytosine methylation in gene body is connected with increased expression. On the other hand, the existence of methylated sites in 5'-flanking regions, rich in CpG dinucleotides (called CpG islands) is associated with gene silencing and repression of transcription [21]. Therefore, it is justified to search for changes in DNA methylation level as a potential mechanism for altered gene expression.

The aim of this study was to determine the transcript level of the *VIT* (Vitrin), *MMP13* (Matrix Metalloproteinase 13), *ACAN* (Aggrecan), and *COL6A5* (Collagen type VI α 5 chain) candidate genes in the muscle and connective tissues dissected from the umbilical ring of pigs with UH and in the muscle tissue of inguinal canal of pigs with IH, and to search for epigenetic mechanisms, such as DNA methylation changes, that are responsible for mRNA level alterations.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics Statement

The samples in this project were collected during routine veterinary procedures. This is permitted under Polish law and does not require the approval of the local Bioethical Commission for Animal Care and Use in Poznan, Poland (13 January 2020).

2.2. Groups, Phenotypes, and Sample Collection

2.2.1. Pigs with Umbilical Hernia

Sixty-eight piglets were derived from a cross between a DunBred (Landrace $\times$ Yorkshire) maternal hybrid line and Landrace or Duroc paternal lines. The animals all came from the same commercial breeding farm located in Wielkopolska Province, Poland. The animals were of both sexes and were aged 3–4 weeks. They were assigned into two groups: 34 animals were classified by veterinarians as umbilical hernia cases, while the control group ($N = 34$) was composed of healthy siblings (animals from the same litter as the hernia cases but showing no signs of hernia). This resulted in 34 full or half sibling pairs, so the affected animal always had a healthy sibling. Most of these pairs were born by different sows with the exception of 5 litters (delivered by 5 sows), where samples were collected from two hernia cases and two healthy controls. The animals were sacrificed by headshot,

which was followed by collection of muscle and connective tissue samples separately from around the navel. Tissue samples were immediately frozen in dry ice for further analysis.

2.2.2. Pigs with Inguinal Hernia

Forty-six unrelated male pigs were included in this part of the analysis. The animals were a cross between the Polish Large White and Polish Landraces and came from local breeding farms. The pigs were divided into four groups on the basis of veterinarian opinion: group G1 contained ten healthy young animals weighing 30–35 kg without any signs of hernia. The second group (G2) consisted of fifteen animals weighing 30–35 kg and with nonregressive inguinal hernias. G3 group contained eleven pigs weighing 30–35 kg with regressed IH (the hernia was at first clinically observed, but disappeared once the animal's body weight exceeded 25 kg). The fourth group (G4) contained ten adult animals weighing 100–120 kg with IH observed throughout their lives. For the G2 and G3 animals, a fragment of the inguinal canal was collected during the delayed castration procedure, while the samples from G1 (at a weight of 30–35 kg) and G4 (at weight of 100–120 kg) were collected post-mortem from the slaughter house.

2.3. RNA Extraction and cDNA Synthesis for qPCR Assay

Total RNA extraction was performed using an RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen, Germantown, MD, USA). The 30 mg of tissue from each sample was homogenized in buffer RTL supplied with the RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen) using TissueLyszer LT (Qiagen). The following steps were performed in line with the manufacturer's instructions. The quantity and quality of total RNA were assessed by using a NanoDrop ND-2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) with 260/280 nm wavelength readings.

Around 1 µg of RNA from each sample was reverse-transcribed using a Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Mannheim, Germany) in a total volume of 20 µL, following the manufacturer's directions. The cDNA was subsequently evaluated with a NanoDrop ND-2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and diluted with nuclease-free water to approximately 700 ng/µL.

2.4. Quantitative Real-Time PCR

The cDNA was used in real-time PCR reactions running on a LightCycler® 480 II (Roche, Mannheim, Germany). We analyzed *ACAN*, *COL6A5*, *MMP13*, and *VIT* from both connective and muscle tissue of 34 healthy animals and 34 animals with umbilical hernia. The procedure was additionally performed on muscle tissue from the inguinal canal for healthy and inguinal hernia pigs (46 animals in total). Primers were designed using Primer3Plus software (version 2.4; <https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>; accessed on 2 June 2021; Supplementary Material Table S1). The reactions for each gene were performed in duplicate using a LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche, Mannheim, Germany) in a total reaction mix of 10 µL per well, following the manufacturer's instructions. The thermocycler program began with an initial denaturation cycle at 95 °C for 10 min, followed by 45 cycles including denaturation at 95 °C for 10 s, annealing at 60 °C for 5 s, and elongation at 72 °C for 5 s. Melting curve analysis was carried out after each amplification in order to verify product specificity. The relative expression values of each gene were computed on the basis of the standard curve method with a series of ten-fold dilutions of a DNA of known concentration (standards). The relative changes in expression level of genes were normalized against the level of reference (internal control) of the *H3F3A* (H3 histone, family 3A) and *PPIA* (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A) genes [22], as described by [23].

2.5. Methylation Analysis

An *in silico* analysis was performed for the two differentially expressed genes, *MMP13* and *VIT*, for which statistically significant results were observed in the transcript level.

The analysis with CpGPlot software (version EMBOSS 6.6.0; http://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_cpgplot/; accessed on 17 November 2022) pointed to several CpG sites in the 5' untranslated region (5'UTR) of the first exon of *MMP13* and in exon 12 of *VIT* (Supplementary Material Table S2).

The PyroMark Assay Design 2.0 software (Qiagen) was used to design primers for the pyrosequencing analysis (Supplementary Material Table S1). Thirty-four animals with umbilical hernia and 34 controls were analyzed in this way. The DNA was isolated from the muscle tissue (the amount of connective tissue was insufficient to perform this analysis) using a Genomic Mini Kit (A&A Biotechnology, Gdańsk, Poland). The quantity and quality of DNA was assessed with the use of a NanoDrop ND-2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) with 260/280 nm wavelength readings. Five hundred nanograms of DNA was bisulfite-converted using an EZ DNA Methylation-Gold kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA). Additionally, nonmethylated controls were prepared using REPLI g Mini Kits (Qiagen), in line with the manufacturer's instructions. The fully methylated controls were prepared from 500 ng of DNA using CpG methyltransferase (*M.SssI*, Thermo Fisher) with incubation for 3 h at 37 °C. Next, PCR was performed with a PyroMark PCR kit (Qiagen), following the manufacturer's instructions. The PCR conditions were: initial denaturation at 95 °C for 15 min; 44 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, primer annealing at 56 °C for both genes, for 30 s and elongation at 72 °C for 30 s, followed by a final extension at 72 °C for 10 min. The negative control samples (without the DNA template) were also prepared for each reaction. PCR amplification results were checked on 1.5% agarose gel electrophoresis. The pyrosequencing reaction for the amplicons was carried out on a PyroMark Q48 Autoprep (Qiagen) system using PyroMark Q48 Advanced CpG Reagents (Qiagen), following the manufacturer's recommended protocol. Finally, PyroMark Q48 Autoprep software (Qiagen) was used to calculate the percentage methylation for each of the CpG sites.

2.6. Statistical Analysis

Statistical analysis was carried out in the R statistical environment (version 4.1.2) [24]. The Shapiro–Wilk test was used to test the normality of the data using the “shapiro.test” function from the “stats” package (version 4.1.2). Subsequently, to compare mRNA results for pigs with UH and controls, a *p*-value was computed using the nonparametric, two-tailed Mann–Whitney U test. The same test was used to compare different DNA methylation levels between the UH and control animals. Each methylated cytosine was examined independently. The “wilcox.test” function was used to calculate *p*-values with parameter “paired = FALSE”. Moreover, adjustment using the Benjamini and Hochberg (1995) [25] procedure (FDR) was performed for the mRNA results using the “p.adjust” function. Finally, the “cor.test” function was applied to perform the Spearman's rank correlation test to examine the significance of the correlation between the *MMP13* relative mRNA level and the CpG methylation level.

Four groups of animals with inguinal hernia were compared. Initially the Shapiro–Wilk test and the Kruskal–Wallis rank sum test were used (“kruskal.test” function from the “stats” package (version 4.1.2)). Subsequently, Dunn's test for multiple comparisons with the FDR correction was chosen as a post hoc test, in order to identify exactly which groups differed, using the “dunnTest” function from the “FSA” package (version 0.9.3). For the performed tests, the statistical significance cutoff was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Relative mRNA Levels of the Studied Genes in the UH Pigs

Quantitative real-time PCR was performed for *MMP13*, *VIT*, *ACAN*, and *COL6A5* in muscle and connective tissue for all 68 animals, revealing differences in the mRNA level of *MMP13* and *VIT* between the control and hernia pigs. The transcript level of *MMP13* was significantly higher in pigs with UH than in the muscle tissue of controls ($p_{adj.} < 0.01$); this was unlike the connective tissue, whose mRNA level was lower in the UH animals

($p_{adj.} < 0.001$). This indicates that the transcript level depends on the analyzed tissue. The only significant result for the *VIT* gene was observed in muscle tissue ($p_{adj.} < 0.05$), where a higher level of mRNA was found in UH pigs than in controls. For *ACAN* and *COL6A5*, the differences proved insignificant in all of the tissues (Figure 1).

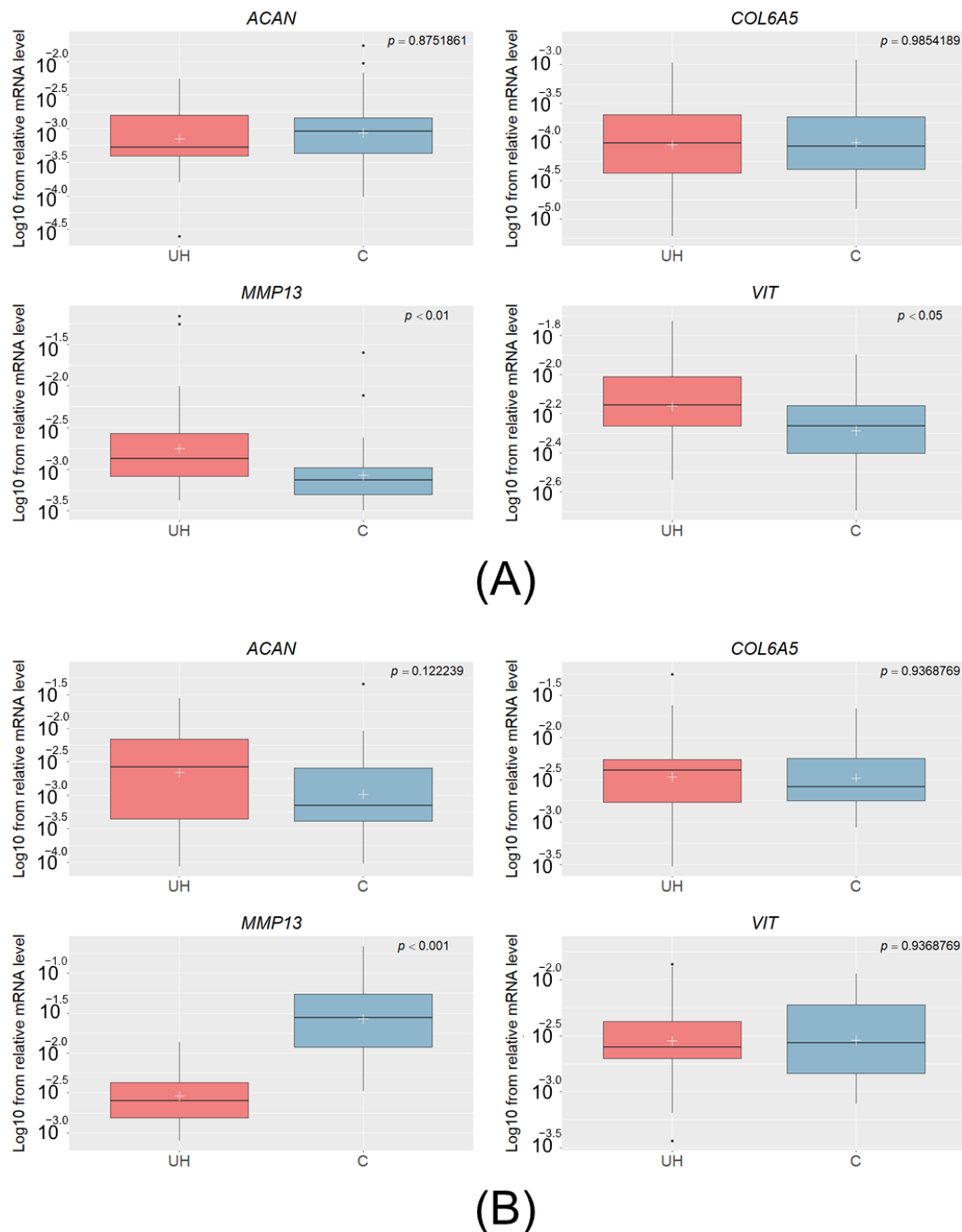


Figure 1. The Log10 of the relative mRNA levels of the *ACAN*, *COL6A5*, *MMP13*, and *VIT* genes in muscle (A) and in connective tissue (B) obtained from the UH (cases) and C (controls) animals. The white crosses denote mean values and the lines crossing the boxes represent medians. The lines under and over the rectangles denote the highest and lowest values, and the black dots under and over the boxes are outliers.

3.2. Relative mRNA Levels of Studied Genes in IH Pigs

The mRNA level was determined for *MMP13*, *VIT*, *ACAN* and *COL6A5*, but the Kruskal–Wallis test indicated significant results only for the *ACAN* ($p = 0.02$) gene. Subsequently, the post hoc test showed significantly lower transcript levels ($p_{adj.} < 0.05$) in group G4 than in groups G1, G2, and G3 (Figure 2), indicating that the altered *ACAN* expression was not related with the presence of hernia. On the other hand, we found that the expression of this gene was significantly downregulated in group G4 represented by adult IH pigs (>100 kg), so the observed differences can be related to the animal's age.

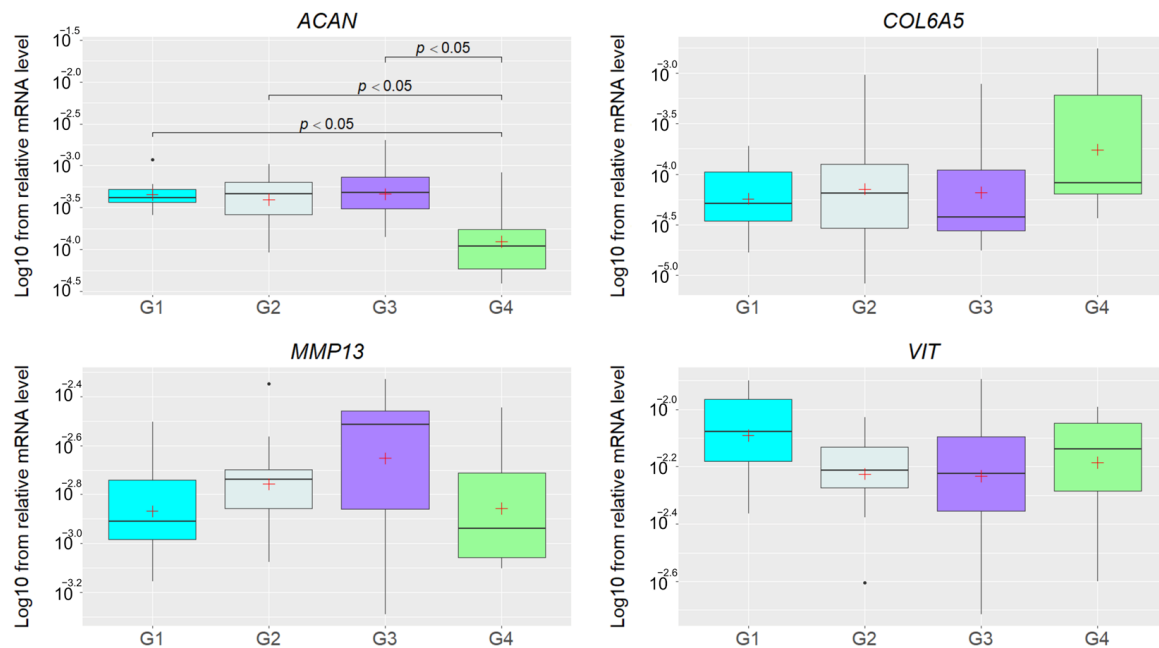


Figure 2. The Log10 of relative mRNA levels of the *ACAN*, *COL6A5*, *MMP13*, and *VIT* genes in groups of pigs without inguinal hernia and with different stages thereof. The white crosses denote mean values and the lines crossing the boxes represent medians. The lines under and over the rectangles denote the highest and lowest values, and the black dots under and over the boxes are outliers. The groups are indicated by G1, G2, G3, and G4.

3.3. CpG Methylation Level

DNA methylation levels were examined in exon 12 for *VIT* and in the 5'UTR for *MMP13*. For both genes, cytosine methylation level was determined in the muscle tissue and seven CpG sites were studied for each gene (Supplementary Material Table S3). Only one statistically significant result was found for the single cytosine marked CpG7 in the *MMP13* gene (chr9: 33616509). In this case, we observed significant higher ($p < 0.001$) cytosine methylation levels in the UH animals (mean = 34%) than in the controls (mean = 29%); see Figure 3. However, there was no significant correlation between the *MMP13* relative mRNA level and the CpG methylation level at this position ($\rho = 0.09342564$; $p = 0.4486$). This observation shows that the DNA methylation of the studied region is probably not responsible for altered transcript level of *MMP13* gene.

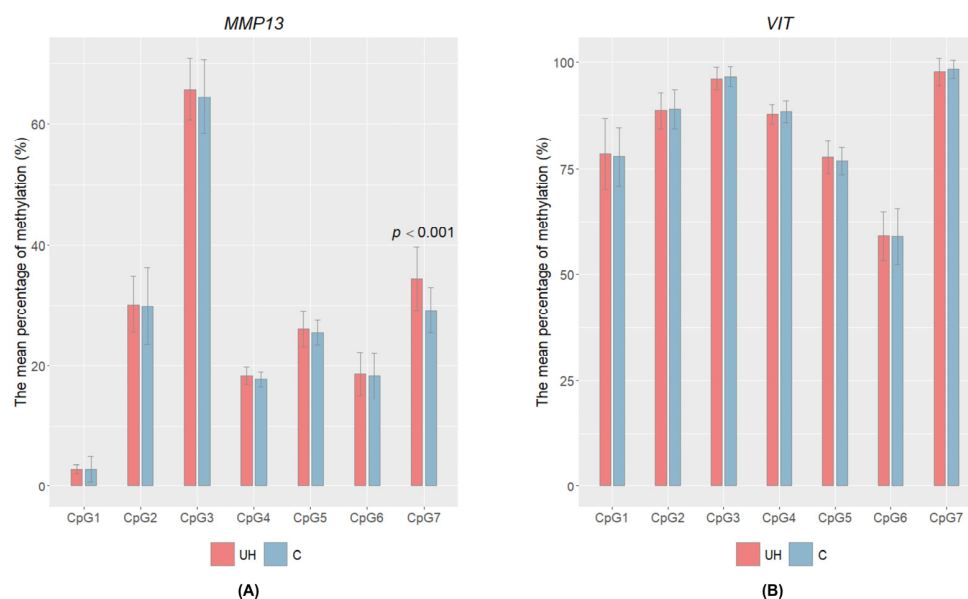


Figure 3. Mean percentage of DNA methylation $\pm$ SD in the CpG of two candidate genes: *MMP13* (A) and *VIT* (B) for UH and control pigs. The cytosines are indicated as CpG1, CpG2, CpG3, CpG4, CpG5, CpG6, and CpG7. Only one significant difference was observed for CpG7 in *MMP13*; the p -value refers only to this cytosine.

4. Discussion

Information on the background of porcine hernia remains scarce [16]. Much effort has been put into identifying genetic variants that predispose to hernia development [5,6,8,15,18,19,26], but the polygenic nature of this condition has made such studies challenging. A new approach involving the transcriptome differences between hernia and control animals was thus undertaken for umbilical and inguinal hernia [6,20].

Here we studied the mRNA levels of four genes (*ACAN*, *COL6A5*, *MMP13*, and *VIT*) initially noted by Souza et al. [6] as strong candidates for hernia formation. The novelty of our study is that, in the case of umbilical hernia, we examined the muscle and connective tissues separately (dissected from the umbilical ring), which has not been done previously [6]. We also determined whether altered transcript levels in muscle tissue might be caused by differences in epigenetic mechanisms (DNA methylation). We additionally checked whether the same genes have altered expression in inguinal canal tissue collected from inguinal hernia pigs.

Our most interesting results were for the *MMP13* gene, in which the transcript level was increased in the muscle tissue and decreased in the connective tissue of the pigs with umbilical hernia. Expression of this gene has previously been associated with inguinal hernia in humans [27], while its downregulation has been noted in pigs with umbilical hernia by Souza et al. [6]. Those researchers, however, studied the transcriptome in a mix of different cell types collected from the umbilical ring. Here we were able to distinguish between muscle and connective tissues and found the opposite results. These differences may be caused by the different molecular function of the *MMP13* protein depending on the expression site. *MMP13* (known also as collagenase-3) is a member of the matrix metalloproteinase (MMP) family, which are proteins that degrade the components of the extracellular matrix and remodel connective tissue [28]. We can thus speculate that the reduced level of the *MMP13* gene in the connective tissue of the affected animals leads to incorrect tissue remodeling and possible lower tissue strength, which can predispose for hernia development. *MMP13* also plays a role in wound healing [29], and it is known that cytokines and growth factors formed under pathological condition induce *MMP* levels [30]. The increased *MMP13* transcript level observed in the muscle tissue in our study might thus be rather a consequence of the hernia condition. It can be suggested that an elevated

level of *MMP13* is needed for wound healing (e.g., that the disruption of muscle tissue by the hernia induces increased repair processes). This hypothesis is supported by earlier studies, in which the involvement of the *MMP13* gene in tissue healing and repair processes has already been confirmed [31,32].

We also checked whether the differences in the mRNA level of the *MMP13* gene are the results of DNA methylation changes. Due to the limited quantity of connective tissue sample, this analysis was performed only for the muscle tissue. We found that in the studied 5'UTR region (exon 1) the methylation level for one cytosine (CpG7) was significantly increased in the affected animals. It is known that the 5'UTR region contains multiple regulatory elements that are important for the correct initiation of translation [33]. Moreover, a recent broad study of DNA methylation changes during human early embryo development concluded that, in the 5'UTR region (where the high CpG density was observed), the methylation level was low and negatively correlated with gene expression [34]. However, in our study, the significantly methylated cytosine in the 5'UTR of the *MMP13* gene did not correlate with the transcript level of the *MMP13* gene. We are thus unable to determine whether the difference we observed in DNA methylation has a significant relation to the hernia condition.

One interesting result concerned elevated transcript levels of the *VIT* gene in UH pigs. This observation did not confirm the result reported by Souza et al. [6], who examined a mix of tissues from the umbilical ring to compare 5 UH with 5 control pigs; they noted that the level of *VIT* expression was reduced. The *VIT* gene encodes an extracellular matrix (ECM) protein, which contains two von Willebrand A domains. It seems that the *VIT* protein is associated with migration and cell adhesion, like the majority of von Willebrand A domain-containing proteins [35,36]. Based on this information, we suggest that the observed overexpression of this gene in muscle tissue may be an effect of the repair mechanism acting in response to muscle damage by the hernia. Our study did not show altered transcript levels of the *ACAN* and *COL6A5* genes in the tissues of the UH pigs.

Interestingly, significant differences in the mRNA level of the *ACAN* gene were found in the IH pigs. Differences were observable between young (group G1, G2, and G3) and old (group G4) pigs, but not between those with inguinal hernia and those which were healthy. We thus assume that the reduced mRNA level of *ACAN* is an effect of aging. It is known that this protein (aggrecan) is a proteoglycan and is a component of the extracellular matrix which exists in form of proteoglycan aggregates. It plays an important role in the function of cartilaginous tissues [37], as well as in skeletal development through its involvement in the endochondral ossification process [38]. Our observation could thus be explained by the role of the *ACAN* protein in collagen production, with young pigs needing higher levels in the intense growth phase, whereas aggrecan in adults is involved in skeletal development. Moreover, *ACAN* is an important element of cartilage extracellular matrix that is reduced as aging of the organism proceeds [39]. The *ACAN* gene was the only gene that was found to be differently expressed in the pigs with inguinal hernia in this study, and no differences were observed for *MMP13*, *VIT*, or *COL6A5*.

5. Conclusions

Pigs with umbilical hernia showed differences in mRNA levels for the *MMP13* gene in muscle and connective tissue dissected from the umbilical ring as well as changes in the DNA methylation of a single cytosine located in the 5'UTR of *MMP13*. This may be the result of the demand for the *MMP13* protein in UH pigs depending on tissue type. The *VIT* gene differed in transcript level in muscle tissues, which may be a result of umbilical hernia, rather than a cause. In the case of inguinal hernia, only the *ACAN* gene showed decreased mRNA levels in the muscle tissue of the inguinal canal in older animals, which may be a consequence of aging rather than pathological status.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded from: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/genes14101903/s1>, Table S1: primer sequences for the *ACAN*, *COL6A5*, *MMP13*, *VIT*, *H3F3A*, and *PPIA* genes used in qPCR and for the *MMP13* and *VIT* genes used in pyrosequencing; Table S2: CpG genomic position according to Sscrofa11.1. and their location in the gene context; Table S3: the mean percentage of DNA methylation with standard deviation and *p*-value in each studied cytosine, in two examined genes (*MMP13* and *VIT*), for both control and umbilical hernia groups.

Author Contributions: Conceptualization: J.N.-W. and M.S.; methodology: J.W., W.L., A.W. and J.N.-W.; software: J.W.; validation: J.W., W.L., A.W. and J.N.-W.; formal analysis: J.W., W.L., A.W. and J.N.-W.; investigation: J.W., W.L., A.W. and J.N.-W.; resources: S.D. and P.P.; data curation: J.W. and J.N.-W.; writing—original draft preparation: J.W. and J.N.-W.; writing—review and editing: J.W., M.S., S.D., P.P. and J.N.-W.; visualization: J.W., supervision: J.N.-W.; project administration: J.N.-W.; funding acquisition: J.N.-W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the National Science Centre, Poland, project No. 2019/33/B/NZ9/00654.

Institutional Review Board Statement: The samples were collected during routine veterinary procedures, which under Polish law do not require the permission of the local Bioethical Commission for Animal Care and Use in Poznan, Poland (13 January 2020).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We thank Rafal Niemyjski and Jaroslaw Krzyszton for their help in sample collection.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Rauw, W.M.; Rydhmer, L.; Kyriazakis, I.; Øverland, M.; Gilbert, H.; Dekkers, J.C.; Hermes, S.; Bouquet, A.; Gómez Izquierdo, E.; Louveau, I.; et al. Prospects for Sustainability of Pig Production in Relation to Climate Change and Novel Feed Resources. *J. Sci. Food Agric.* **2020**, *100*, 3575–3586. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Gerber, P.J.; Vellinga, T.V.; Steinfeld, H. Issues and Options in Addressing the Environmental Consequences of Livestock Sector's Growth. *Meat Sci.* **2010**, *84*, 244–247. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Davoli, R.; Braglia, S. Molecular Approaches in Pig Breeding to Improve Meat Quality. *Brief. Funct. Genom. Proteom.* **2008**, *6*, 313–321. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Thorslund, C.A.H.; Aaslyng, M.D.; Lassen, J. Perceived Importance and Responsibility for Market-Driven Pig Welfare: Literature Review. *Meat Sci.* **2017**, *125*, 37–45. [\[CrossRef\]](#)
5. Lago, L.; Nery Da Silva, A.; Zanella, E.; Groke Marques, M.; Peixoto, J.; Da Silva, M.; Ledur, M.; Zanella, R. Identification of Genetic Regions Associated with Scrotal Hernias in a Commercial Swine Herd. *Vet. Sci.* **2018**, *5*, 15. [\[CrossRef\]](#)
6. Souza, M.R.; Ibelli, A.M.G.; Savoldi, I.R.; Cantão, M.E.; Peixoto, J.D.O.; Mores, M.A.Z.; Lopes, J.S.; Coutinho, L.L.; Ledur, M.C. Transcriptome Analysis Identifies Genes Involved with the Development of Umbilical Hernias in Pigs. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0232542. [\[CrossRef\]](#)
7. Rodrigues, A.F.G.; Ibelli, A.M.G.; Peixoto, J.D.O.; Cantão, M.E.; Oliveira, H.C.D.; Savoldi, I.R.; Souza, M.R.; Mores, M.A.Z.; Carreño, L.O.D.; Ledur, M.C. Genes and SNPs Involved with Scrotal and Umbilical Hernia in Pigs. *Genes* **2021**, *12*, 166. [\[CrossRef\]](#)
8. Grindflek, E.; Hansen, M.H.S.; Lien, S.; Van Son, M. Genome-Wide Association Study Reveals a QTL and Strong Candidate Genes for Umbilical Hernia in Pigs on SSC14. *BMC Genom.* **2018**, *19*, 412. [\[CrossRef\]](#)
9. Hammoud, M.; Gerken, J. Inguinal Hernia. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2023.
10. Liao, Y.; Smyth, G.K.; Shi, W. The R Package Rsubread Is Easier, Faster, Cheaper and Better for Alignment and Quantification of RNA Sequencing Reads. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, e47. [\[CrossRef\]](#)
11. Mikami, H.; Fredeen, H.T. A GENETIC STUDY OF CRYPTORCHIDISM AND SCROTAL HERNIA IN PIGS. *Can. J. Genet. Cytol.* **1979**, *21*, 9–19. [\[CrossRef\]](#)
12. Searcy-Bernal, R.; Gardner, I.A.; Hird, D.W. Effects of and Factors Associated with Umbilical Hernias in a Swine Herd. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **1994**, *204*, 1660–1664. [\[PubMed\]](#)
13. Thaller, G.; Dempfle, L.; Hoeschele, I. Investigation of the Inheritance of Birth Defects in Swine by Complex Segregation Analysis. *J. Anim. Breed. Genet.* **1996**, *113*, 77–92. [\[CrossRef\]](#)
14. Sevillano, C.A.; Lopes, M.S.; Harlizius, B.; Hanenberg, E.; Knol, E.F.; Bastiaansen, J. Genome-Wide Association Study Using Deregressed Breeding Values for Cryptorchidism and Scrotal/Inguinal Hernia in Two Pig Lines. *Genet. Sel. Evol.* **2015**, *47*, 18. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

15. Ding, N.S.; Mao, H.R.; Guo, Y.M.; Ren, J.; Xiao, S.J.; Wu, G.Z.; Shen, H.Q.; Wu, L.H.; Ruan, G.F.; Brenig, B.; et al. A Genome-Wide Scan Reveals Candidate Susceptibility Loci for Pig Hernias in an Intercross between White Duroc and Erhualian1. *J. Anim. Sci.* **2009**, *87*, 2469–2474. [\[CrossRef\]](#)
16. Nowacka-Woszek, J. The Genetic Background of Hernia in Pigs: A Review. *Livest. Sci.* **2021**, *244*, 104317. [\[CrossRef\]](#)
17. Krupova, Z. Candidate Genes for Congenital Malformations in Pigs. *Acta Fytotechn Zootech.* **2021**, *24*, 309–314. [\[CrossRef\]](#)
18. Long, Y.; Su, Y.; Ai, H.; Zhang, Z.; Yang, B.; Ruan, G.; Xiao, S.; Liao, X.; Ren, J.; Huang, L.; et al. A Genome-Wide Association Study of Copy Number Variations with Umbilical Hernia in Swine. *Anim. Genet.* **2016**, *47*, 298–305. [\[CrossRef\]](#)
19. Li, X.; Xu, P.; Zhang, C.; Sun, C.; Li, X.; Han, X.; Li, M.; Qiao, R. Genome-wide Association Study Identifies Variants in the CAPN 9 Gene Associated with Umbilical Hernia in Pigs. *Anim. Genet.* **2019**, *50*, 162–165. [\[CrossRef\]](#)
20. Romano, G.D.S.; Ibelli, A.M.G.; Lorenzetti, W.R.; Weber, T.; Peixoto, J.D.O.; Cantão, M.E.; Mores, M.A.Z.; Morés, N.; Pedrosa, V.B.; Coutinho, L.L.; et al. Inguinal Ring RNA Sequencing Reveals Downregulation of Muscular Genes Related to Scrotal Hernia in Pigs. *Genes* **2020**, *11*, 117. [\[CrossRef\]](#)
21. Greenberg, M.V.C.; Bourc’his, D. The Diverse Roles of DNA Methylation in Mammalian Development and Disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2019**, *20*, 590–607. [\[CrossRef\]](#)
22. Lorenzetti, W.R.; Ibelli, A.M.G.; Peixoto, J.D.O.; Mores, M.A.Z.; Savoldi, I.R.; Carmo, K.B.D.; Oliveira, H.C.D.; Ledur, M.C. Identification of Endogenous Normalizing Genes for Expression Studies in Inguinal Ring Tissue for Scrotal Hernias in Pigs. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0204348. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Vandesompele, J.; De Preter, K.; Pattyn, F.; Poppe, B.; Van Roy, N.; De Paepe, A.; Speleman, F. Accurate Normalization of Real-Time Quantitative RT-PCR Data by Geometric Averaging of Multiple Internal Control Genes. *Genome Biol.* **2002**, *3*, research0034.1. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2021. Available online: <https://www.R-Project.Org> (accessed on 10 February 2022).
25. Benjamini, Y.; Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. B Stat. Methodol.* **1995**, *57*, 289–300. [\[CrossRef\]](#)
26. Wozniak, J.; Loba, W.; Iskrzak, P.; Pszczola, M.; Wojtczak, J.; Switonski, M.; Nowacka-Woszek, J. A Confirmed Association between DNA Variants in CAPN9, OSM, and ITGAM Candidate Genes and the Risk of Umbilical Hernia in Pigs. *Anim. Genet.* **2023**, *54*, 307–314. [\[CrossRef\]](#)
27. Zheng, Z.S.; Reiner Kasperk, H. Recurrent Inguinal Hernia: Disease of the Collagen Matrix? *World J. Surg.* **2002**, *26*, 401–408. [\[CrossRef\]](#)
28. Bracale, U.; Peltrini, R.; Iacone, B.; Martirani, M.; Sannino, D.; Gargiulo, A.; Corcione, F.; Serra, R.; Bracale, U.M. A Systematic Review on the Role of Matrix Metalloproteinases in the Pathogenesis of Inguinal Hernias. *Biomolecules* **2023**, *13*, 1123. [\[CrossRef\]](#)
29. Amar, S.; Smith, L.; Fields, G.B. Matrix Metalloproteinase Collagenolysis in Health and Disease. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Mol. Cell Res.* **2017**, *1864*, 1940–1951. [\[CrossRef\]](#)
30. Vincenti, M.P.; Brinckerhoff, C.E. Transcriptional Regulation of Collagenase (MMP-1, MMP-13) Genes in Arthritis: Integration of Complex Signaling Pathways for the Recruitment of Gene-Specific Transcription Factors. *Arthritis Res. Ther.* **2002**, *4*, 157. [\[CrossRef\]](#)
31. Toriseva, M.; Laato, M.; Carpen, O.; Ruohonen, S.T.; Savontaus, E.; Inada, M.; Krane, S.M.; Kähäri, V.-M. MMP-13 Regulates Growth of Wound Granulation Tissue and Modulates Gene Expression Signatures Involved in Inflammation, Proteolysis, and Cell Viability. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e42596. [\[CrossRef\]](#)
32. Lei, H.; Leong, D.; Smith, L.R.; Barton, E.R. Matrix Metalloproteinase 13 Is a New Contributor to Skeletal Muscle Regeneration and Critical for Myoblast Migration. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2013**, *305*, C529–C538. [\[CrossRef\]](#)
33. Barrett, L.W.; Fletcher, S.; Wilton, S.D. Regulation of Eukaryotic Gene Expression by the Untranslated Gene Regions and Other Non-Coding Elements. *Cell Mol. Life Sci.* **2012**, *69*, 3613–3634. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Luo, R.; Bai, C.; Yang, L.; Zheng, Z.; Su, G.; Gao, G.; Wei, Z.; Zuo, Y.; Li, G. DNA Methylation Subpatterns at Distinct Regulatory Regions in Human Early Embryos. *Open Biol.* **2018**, *8*, 180131. [\[CrossRef\]](#)
35. Colombatti, A.; Bonaldo, P.; Doliana, R. Type A Modules: Interacting Domains Found in Several Non-Fibrillar Collagens and in Other Extracellular Matrix Proteins. *Matrix* **1993**, *13*, 297–306. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Whittaker, C.A.; Hynes, R.O. Distribution and Evolution of von Willebrand/Integrin A Domains: Widely Dispersed Domains with Roles in Cell Adhesion and Elsewhere. *MBoC* **2002**, *13*, 3369–3387. [\[CrossRef\]](#)
37. Roughley, P.J.; Mort, J.S. The Role of Aggrecan in Normal and Osteoarthritic Cartilage. *J. Exp. Ortop.* **2014**, *1*, 8. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Aspberg, A. The Different Roles of Aggrecan Interaction Domains. *J. Histochem. Cytochem.* **2012**, *60*, 987–996. [\[CrossRef\]](#)
39. Miranda-Duarte, A. DNA Methylation in Osteoarthritis: Current Status and Therapeutic Implications. *TORJ* **2018**, *12*, 37–49. [\[CrossRef\]](#)

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Supplementary Material for: “Altered transcript levels of *MMP13* and *VIT* genes in the muscle and connective tissue of pigs with umbilical hernia”, by Jakub Wozniak et al.

Table S1. Primer sequences for the *ACAN*, *COL6A5*, *MMP13*, *VIT*, *H3F3A* and *PPIA* genes used in qPCR and for the *MMP13* and *VIT* genes used in pyrosequencing.

Analysis	Target gene	Primer sequence	Amplicon size
qPCR	<i>ACAN</i>	F: 5' CAGGAGGGGTTGTGTTCCATTA 3' R: 5' CCTCCTCGAAAGTCAGTGAGTAG 3'	63 bp
	<i>COL6A5</i>	F: 5' AGCTTTGGGCAGAACTTTGA 3' R: 5' TGCCAGAACTATCCACCAGA 3'	124 bp
	<i>MMP13</i>	F: 5' AAGAGCATGGAGACTTCTACCC 3' R: 5' GGAGGAAAAGCATGAGCCAA 3'	64 bp
	<i>VIT</i>	F: 5' GTCGAAGCCACCCACACTG 3' R: 5' AAGTCAGGTTCTCCCCCA 3'	119bp
	<i>H3F3A</i>	F: 5' CTTTGCAGGAGGCAAGTGAG 3' R: 5' TGGCATGGATAGCACACAGG 3'	72 bp
	<i>PPIA</i>	F: 5' CACAAACGGTTCCTCAGTTTT 3' R: 5' TGTCCACAGTCAGCAATGGT 3'	171 bp
pyrosequencing	<i>MMP13</i>	F: GGTTATGATGATTAAGTAAAGGTTAGT R-biot*: TCCACCAACTCCAACAACCTCT Seq**: AGAGATAGTTTATAAAAATTTTGTG	318 bp
	<i>VIT</i>	F: GAGGTAGGTTGGAGGATGAGATTT R-biot*: TATCAAACCTCCTTACTAAAATTAACCACAAA Seq**: TTTGTAGTAAGATTTGTTTGAA	292 bp

PCR primers were designed based on pig genome sequence: Sscrofa11.1 (*ACAN* - GenBank ID: 397255, *COL6A5* - GenBank ID: 100515967, *MMP13* - GenBank ID: 397346, *VIT* - GenBank ID: 100524557). *reverse primer labeled with biotin; **sequencing primer

Table S2. CpG genomic position according to Sscrofa11.1. and their location in the gene context.

Gene	Cytosines	Chromosome position	Gene context
<i>MMP13</i>	CpG1	chr9: 33616595	5'UTR (exon 1, variant X2)
	CpG2	chr9: 33616586	5'UTR (exon 1, variant X2)
	CpG3	chr9: 33616563	5'UTR (exon 1, variant X2)
	CpG4	chr9: 33616557	5'UTR (exon 1, variant X2)
	CpG5	chr9: 33616546	5'UTR (exon 1, variant X2)
	CpG6	chr9: 33616521	5'UTR (exon 1, variant X2)
	CpG7	chr9: 33616509	5'UTR (exon 1, variant X2)
<i>VIT</i>	CpG1	chr3: 103384464	exon 12, variant X4
	CpG2	chr3: 103384458	exon 12, variant X4
	CpG3	chr3: 103384452	exon 12, variant X4
	CpG4	chr3: 103384446	exon 12, variant X4
	CpG5	chr3: 103384443	exon 12, variant X4
	CpG6	chr3: 103384431	exon 12, variant X4
	CpG7	chr3: 103384412	exon 12, variant X4

CpG positions were selected based on pig genome sequence: Sscrofa11.1 (*MMP13* - GenBank ID: 397346, *VIT* - GenBank ID: 100524557).

Table S3. The mean percentage of DNA methylation with standard deviation and p-value in each studied cytosine, in two examined genes (*MMP13* and *VIT*), for both control and umbilical hernia groups.

Gene	Cytosines	Umbilical hernia group		Control group		p-value
		Mean	Standard deviation	Mean	Standard deviation	
<i>MMP13</i>	CpG1	2.7941	0.7294	2.8235	2.0371	0.1593
	CpG2	30.1765	4.6546	29.9706	6.4172	0.6436
	CpG3	65.7059	5.1081	64.5294	6.0914	0.1477
	CpG4	18.3235	1.4296	17.7353	1.1886	0.0993
	CpG5	26.0882	2.9580	25.5000	2.0634	0.4793
	CpG6	18.6471	3.5665	18.3235	3.8433	0.7273
	CpG7	34.4118	5.2346	29.1765	3.7374	p<0.001
<i>VIT</i>	CpG1	78.4118	8.3016	77.7647	6.8625	0.4572
	CpG2	88.6177	4.2783	88.9412	4.6250	0.8578
	CpG3	96.2059	2.5320	96.6471	2.3469	0.5147
	CpG4	87.7059	2.2500	88.2353	2.5113	0.6896
	CpG5	77.7059	3.6889	76.7647	3.1533	0.2367
	CpG6	59.1765	5.7812	59.0882	6.5983	0.9706
	CpG7	97.7059	3.1482	98.3529	2.0727	0.7742

Załącznik 1b

Prof. dr hab. Joanna Nowacka – Woszek

imię i nazwisko promotora / ~~promotorów / promotora pomocniczego~~

Oświadczenie promotora(-ów) rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska pt.: **Identyfikacja markerów genetycznych i epigenetycznych związanych z występowaniem przepukliny pępkowej świń** została przygotowana pod moim/naszym kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data 06.05.2025

Podpis promotora rozprawy

Nowacka-Woszek

~~Podpis promotora / promotora pomocniczego rozprawy~~

.....

Jakub Woźniak

imię i nazwisko doktoranta

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

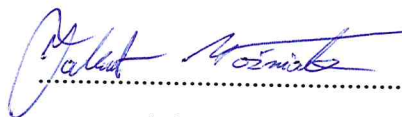
Niniejszym oświadczam, że przedłożoną rozprawę doktorską pt.: **Identyfikacja markerów genetycznych i epigenetycznych związanych z występowaniem przepukliny pępkowej świń** napisałem samodzielnie, tj.:

- nie zleciłem opracowania rozprawy lub jej części innym osobom,
- nie przepisałem rozprawy lub jej części z innych opracowań i prac związanych tematycznie z moją pracą,
- korzystałem jedynie z niezbędnych konsultacji,
- wszystkie elementy rozprawy, które zostały wykorzystane do jej realizacji (cytaty, ryciny, tabele, programy itp.), a nie będące mojego autorstwa, zostały odpowiednio zaznaczone wraz z podaniem źródła ich pochodzenia,
- rozprawa nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Mam świadomość, że złożenie nieprawdziwego oświadczenia skutkować będzie niedopuszczeniem do dalszych czynności postępowania w sprawie nadania stopnia doktora lub cofnięciem decyzji o nadaniu mi stopnia doktora oraz wszczęciem postępowania dyscyplinarnego.

Data 06.05.2025



podpis autora rozprawy

Załącznik 2

mgr Jakub Woźniak

Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt

Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Wozniak, J., Loba, W., Iskrzak, P., Pszczola, M., Wojtczak, J., Switonski, M., & Nowacka-Woszuk, J. (2023). A confirmed association between DNA variants in *CAPN9*, *OSM*, and *ITGAM* candidate genes and the risk of umbilical hernia in pigs. *Animal Genetics*, 54(3), 307–314, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na udziale w izolacji DNA, sekwencjonowaniu fragmentu genu *CAPN9*, *OSM* i *ITGAM*, analizie statystycznej, interpretacji wyników, przygotowaniu rycin, napisaniu pierwszej wersji manuskryptu i uczestnictwu w jej edycji oraz odpowiedzi na recenzje. Mój indywidualny udział w przygotowaniu tej publikacji szacuję na 55%.

Niniejszym oświadczam, że w pracy Wozniak, J., Loba, W., Wysocka, A., Dzimira, S., Prządka, P., Switonski, M., & Nowacka-Woszuk, J. (2023). Altered transcript levels of *MMP13* and *VIT* genes in the muscle and connective tissue of pigs with umbilical hernia. *Genes*, 14(10), 1903, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na udziale w izolacji RNA i DNA, analizie poziomu transkryptu przy wykorzystaniu PCR w czasie rzeczywistym dla genów *MMP13*, *VIT*, *COL6A5* i *ACAN*, analizie poziomu metylacji przy wykorzystaniu pirosekwencjonowania dla fragmentów genów *MMP13* i *VIT*, analizie statystycznej, interpretacji wyników, przygotowaniu rycin, napisaniu pierwszej wersji manuskryptu i uczestnictwu w jej edycji oraz odpowiedzi na recenzje. Mój indywidualny udział w przygotowaniu tej publikacji szacuję na 60%.

Data 06.05.2025

Podpis



Załącznik 2

dr hab. inż. Marcin Pszczoła

Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt

Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Wozniak, J., Loba, W., Iskrzak, P., Pszczoła, M., Wojtczak, J., Switonski, M., & Nowacka-Woszek, J. (2023). A confirmed association between DNA variants in *CAPN9*, *OSM*, and *ITGAM* candidate genes and the risk of umbilical hernia in pigs. *Animal Genetics*, 54(3), 307–314, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pomocy w analizie statystycznej i interpretacji wyników. Udział ten szacuję na 10%.

Data17.04.2025.....

Podpis



Załącznik 2

lek. wet Paweł Iskrzak

Ceva Animal Health Polska

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Wozniak, J., Loba, W., Iskrzak, P., Pszczola, M., Wojtczak, J., Switonski, M., & Nowacka-Woszuk, J. (2023). A confirmed association between DNA variants in *CAPN9*, *OSM*, and *ITGAM* candidate genes and the risk of umbilical hernia in pigs. *Animal Genetics*, 54(3), 307–314, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pobraniu prób do badań i kwalifikacji zwierząt do badanych grup. Udział ten szacuję na 5%.

Data 17.04.2025

Podpis

Paweł Iskrzak

Załącznik 2

dr inż. Janusz Wojtczak

Katedry Hodowli Zwierząt i Oceny Surowców

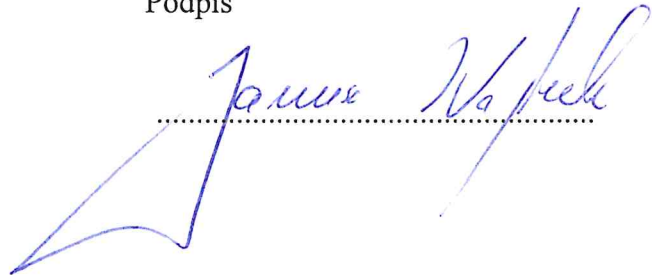
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Wozniak, J., Loba, W., Iskrzak, P., Pszczola, M., Wojtczak, J., Switonski, M., & Nowacka-Woszuk, J. (2023). A confirmed association between DNA variants in *CAPN9*, *OSM*, and *ITGAM* candidate genes and the risk of umbilical hernia in pigs. *Animal Genetics*, 54(3), 307–314, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pobraniu prób do badań i kwalifikacji zwierząt do badanych grup. Udział ten szacuję na 5%.

Data 18.04.2025.

Podpis

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Janusz Wojtczak', written over a horizontal dotted line.

Załącznik 2

mgr inż. Weronika Loba-Pasternak
Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Wozniak, J., Loba, W., Iskrzak, P., Pszczola, M., Wojtczak, J., Switonski, M., & Nowacka-Woszek, J. (2023). A confirmed association between DNA variants in *CAPN9*, *OSM*, and *ITGAM* candidate genes and the risk of umbilical hernia in pigs. *Animal Genetics*, 54(3), 307–314, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na udziale w izolacji DNA, sekwencjonowaniu fragmentu genu *CAPN9* i analizie statystycznej dla genu *CAPN9*. Udział ten szacuję na 5%.

Niniejszym oświadczam, że w pracy Wozniak, J., Loba, W., Wysocka, A., Dzimira, S., Prządka, P., Switonski, M., & Nowacka-Woszek, J. (2023). Altered transcript levels of *MMP13* and *VIT* genes in the muscle and connective tissue of pigs with umbilical hernia. *Genes*, 14(10), 1903, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na udziale w izolacji RNA oraz w analizie poziomu transkryptu przy wykorzystaniu PCR w czasie rzeczywistym dla dwóch genów. Udział ten szacuję na 5%.

Data 14.04.2025

Podpis

Weronika Loba-Pasternak

Załącznik 2

prof. dr hab. Marek Świtoński

Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt

Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

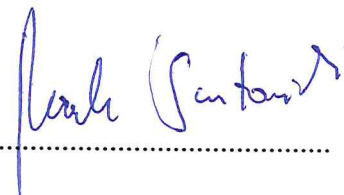
Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Wozniak, J., Loba, W., Iskrzak, P., Pszczola, M., Wojtczak, J., Switonski, M., & Nowacka-Woszuk, J. (2023). A confirmed association between DNA variants in *CAPN9*, *OSM*, and *ITGAM* candidate genes and the risk of umbilical hernia in pigs. *Animal Genetics*, 54(3), 307–314, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na uczestniczeniu w interpretacji wyników i sformułowaniu wniosków. Udział ten szacuję na 5%.

Niniejszym oświadczam, że w pracy Wozniak, J., Loba, W., Wysocka, A., Dzimira, S., Prządka, P., Switonski, M., & Nowacka-Woszuk, J. (2023). Altered transcript levels of *MMP13* and *VIT* genes in the muscle and connective tissue of pigs with umbilical hernia. *Genes*, 14(10), 1903, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na uczestniczeniu w interpretacji wyników i sformułowaniu wniosków. Udział ten szacuję na 5%.

Data17.04.2025.....

Podpis

.....

Załącznik 2

prof. dr hab. inż. Joanna Nowacka-Woszek
Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Wozniak, J., Loba, W., Iskrzak, P., Pszczola, M., Wojtczak, J., Switonski, M., & Nowacka-Woszek, J. (2023). A confirmed association between DNA variants in *CAPN9*, *OSM*, and *ITGAM* candidate genes and the risk of umbilical hernia in pigs. *Animal Genetics*, 54(3), 307–314, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pomocy merytorycznej w następujących aspektach: koncepcji badań, analizy statystycznej, prezentacji wyników, dyskusji, przygotowaniu maszynopisu i odpowiedzi na recenzje. Udział ten szacuję na 15%.

Niniejszym oświadczam, że w pracy Wozniak, J., Loba, W., Wysocka, A., Dzimira, S., Prządka, P., Switonski, M., & Nowacka-Woszek, J. (2023). Altered transcript levels of *MMP13* and *VIT* genes in the muscle and connective tissue of pigs with umbilical hernia. *Genes*, 14(10), 1903, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pomocy merytorycznej w następujących aspektach: koncepcji badań, analizy statystycznej, prezentacji wyników, dyskusji, przygotowaniu maszynopisu i odpowiedzi na recenzje. Udział ten szacuję na 15%.

Data 17/10/2025

Podpis

Nowacka-Woszek

Załącznik 2

dr hab. Stanisław Dzimira, prof. uczelni
Katedra Patologii
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Wozniak, J., Loba, W., Wysocka, A., Dzimira, S., Prządka, P., Switonski, M., & Nowacka-Woszuk, J. (2023). Altered transcript levels of *MMP13* and *VIT* genes in the muscle and connective tissue of pigs with umbilical hernia. *Genes*, 14(10), 1903, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pobraniu prób do badań i kwalifikacji zwierząt do badanych grup. Udział ten szacuję na 5%.

16.04.2025

Data

Stanisław Dzimira

Podpis

Załącznik 2

dr hab. prof. uczelni Przemysław Przadka
Katedra i Klinika Chirurgii
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Wozniak, J., Loba, W., Wysocka, A., Dzimira, S., Przadka, P., Switonski, M., & Nowacka-Woszuk, J. (2023). Altered transcript levels of *MMP13* and *VIT* genes in the muscle and connective tissue of pigs with umbilical hernia. *Genes*, 14(10), 1903, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na pobraniu prób do badań i kwalifikacji zwierząt do badanych grup. Udział ten szacuję na 5%.

Data

17.04.2025 v

Podpis

Przemysław Przadka

Załącznik 2

mgr inż. Alicja Wysocka

Instytut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk, Poznań

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy Wozniak, J., Loba, W., Wysocka, A., Dzimira, S., Prządka, P., Switonski, M., & Nowacka-Woszek, J. (2023). Altered transcript levels of *MMP13* and *VIT* genes in the muscle and connective tissue of pigs with umbilical hernia. *Genes*, 14(10), 1903, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na udziale w izolacji RNA oraz w analizie poziomu transkryptu przy wykorzystaniu PCR w czasie rzeczywistym dla dwóch genów. Udział ten szacuję na 5%.

Data 23.04.2025

Podpis

Alice Wysocka