

Jastrzębiec, 14 sierpnia 2025 r.

Prof. dr hab. Mariusz Pierzchała

Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN w Jastrzębcu

Recenzja pracy doktorskiej mgr Jakuba Woźniaka

pt. „Identyfikacja markerów genetycznych i epigenetycznych związanych z występowaniem przepukliny pępkowej świń”

Promotor: prof. dr hab. Joanna Nowacka-Woszek

Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Ocena formalna

Przedstawiona do recenzji dysertacja obejmuje cykl publikacji spójnych tematycznie i metodologicznie, poświęconych identyfikacji markerów genetycznych i epigenetycznych związanych z występowaniem przepukliny pępkowej u świń (UH). W skład cyklu wchodzi dwie opublikowane prace: w „Animal Genetics” (2023) — potwierdzająca związek wariantów w genach CAPN9, OSM i ITGAM z ryzykiem przepukliny pępkowej (— oraz w „Genes” (2023) — dotycząca zróżnicowania poziomów transkryptów MMP13 i VIT w tkance mięśniowej i łącznej pierścienia pępkowego; trzeci manuskrypt (2025) złożono do „BMC Genomics” i dotyczy on kandydata METTL21C w ujęciu multi-omicznym (DNA/RNA/metylacja). Dysertacja zawiera właściwie skonstruowany wstęp, wyszczególnione cele ogólne i szczegółowe, opis materiału i metod, wyniki, pogłębioną dyskusję oraz wnioski — co jest zgodne z wymogami stawianymi rozprawom w dyscyplinie zootechnika i rybactwo.

Ocena merytoryczna

1) Tematyka badań i ich znaczenie

Przepuklina pępkowa należy do częstych wad rozwojowych u trzody chlewnej, powodując problemy hodowlane w tym w szczególności zaburzenie dobrostanu zwierząt, występowanie tej wady przekłada się na też na wymierne straty ekonomiczne. Etiologia przepukliny pępkowej ma charakter wieloczynnikowy obejmując komponent genetyczny jak czynniki środowiskowe. W związku z elementem genetycznej determinacji, diagnostyka molekularna może być kluczowa dla opracowanie efektywnych strategii ograniczania częstości tej wady. Postęp w genomice świń (GWAS), transkryptomice i epigenetyce w ostatnich latach dostarczył nowych dowodów wskazujących na udziału różnych regionów genomu świni w występowaniu tej wady, w tym chromosomu 14 u świni (SSC14) oraz szeregu genów związanych z

macierzą zewnątrzkomórkową (ECM), metabolizmem kolagenu, adhezją komórkową i odpowiedzią zapalną. Dysertacja wpisuje się w aktualny nurt badań, jednocześnie poszerzając zakres analiz, integrując dane asocjacyjne wariantów genów, profilowanie transkryptów oraz analizę metylacji DNA w obszarach potencjalnych genów kandydujących. Takie właśnie szerokie podejście zwiększa szanse identyfikacji markerów i biomarkerów użytecznych w hodowli.

2) *Oryginalność tematyki i wartość poznawcza*

Oryginalność przedstawionej do oceny dysertacji polega w głównej mierze na zintegrowaniu różnych podejść analitycznych takich jak: 1) analiza asocjacji wariantów polimorficznych DNA w genach kandydujących z literatury 2) ocena różnic w ekspresji genów w precyzyjnie zdefiniowanych tkankach pierścienia pępkowego, oraz 3) weryfikacja zmian epigenetycznych w wybranych genach, jako potencjalnych kluczowych elementów regulacyjnych. Takie wielopoziomowe ujęcie rzadko bywało stosowane w badaniach przepukliny pępkowej przez co stanowi istotny walor poznawczy niniejszej dysertacji.

3) Zdefiniowanie celów/hipotez badawczych

Cele rozprawy doktorskiej zostały sformułowane w sposób jasny i dobrze umotywowany merytorycznie. Obejmowały one: analizę strukturalnych i funkcjonalnych elementów genomu świni, w tym ocenę polimorfizmu markerów genetycznych (SNP/CNV), badanie różnic ekspresji genów w tkankach pierścienia pępkowego, analizę metylacji DNA w wybranych genach kandydujących oraz kompleksową integrację uzyskanych wyników w celu wskazania markerów potencjalnie użytecznych w selekcji świń. Tak zdefiniowane cele były w pełni adekwatne do weryfikacji postawionej hipotezy badawczej, zakładającej poligenowy charakter przepukliny pępkowej, modulowany przez mechanizmy epigenetyczne. Realizacja tego założenia została oparta na zastosowaniu nowoczesnych metod i technik molekularnych, odpowiednich do skali i złożoności problemu.

4) *Zakres i metody badań*

Autor zastosował szeroki wachlarz nowoczesnych metod biologii molekularnej, starannie dobranych do założonych celów badawczych, co zapewniło komplementarność i wysoką wiarygodność uzyskanych danych. Wykorzystano m.in. sekwencjonowanie Sangera i RNA-seq, qPCR oraz ddPCR do analizy CNV, pirosekwencjonowanie do oceny metylacji DNA, a także Western blot w celu weryfikacji zmian na poziomie białek. Uzupełnieniem były zaawansowane analizy bioinformatyczne różnic w ekspresji genów, obejmujące m.in. identyfikację i interpretację wzbogaconych szlaków biologicznych. Niewątpliwym

atutem pracy jest starannie zaplanowany dobór materiału biologicznego, który ograniczył heterogeniczność prób i znacząco zwiększył rzetelność uzyskanych wyników.

Synteza wyników prezentowanych w dysertacji

W **Pracy nr 1 (Animal Genetics, 2023)** autor potwierdził asocjacje wariantów w obrębie genów *CAPN9*, *OSM* i *ITGAM* z ryzykiem występowania przepukliny pępkowej, weryfikując wyniki uzyskane w badaniach GWAS dla świń rasy Landrace (region SSC14 ~50 Mb). Walidacja tych sygnałów na niezależnym materiale hodowlanym stanowi istotną wartość, wzmacniając wiarygodność wcześniejszych doniesień i podkreślając znaczenie wspomnianych genów jako kandydatów w patogenezie badanej wady rozwojowej.

W **Pracy nr 2 (Genes, 2023)** wykazano zróżnicowanie poziomów transkryptów genów *MMP13* i *VIT* w zależności od rodzaju tkanki, a także swoiste różnice w metylacji DNA (*MMP13*). Wyniki te wpisują się w dotychczasowe obserwacje oparte na analizach RNA-seq, wskazujące na kluczową rolę procesów związanych z organizacją macierzy zewnątrzkomórkowej, metabolizmem kolagenu, adhezją komórkową i odpowiedzią immunologiczną w powstawaniu przepukliny pępkowej.

W **Pracy nr 3 (BMC Genomics, 2025 – w recenzji)** przedstawiono wielopoziomową analizę, łączącą informacje o wariantach w regionach regulatorowych, metylacji DNA i ekspresji genów. Uzyskane wyniki wskazują na udział mechanizmów regulacyjnych wpływających zarówno na odpowiedź tkanki mięśniowej, jak i przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej. Kompleksowe ujęcie obejmujące poziomy metylacji DNA, i ekspresję mRNA należy uznać za istotny krok w kierunku wyjaśnienia molekularnych podstaw przepukliny pępkowej u świń.

Konfrontacja wyników z dysertacji z aktualnym stanem wiedzy

Otrzymane wyniki w istotny sposób poszerzają wiedzę o molekularnych mechanizmach leżących u podstaw przepukliny pępkowej u świń, potwierdzając jej złożoną, poligeniczną etiologię, zależną również od specyfiki puli genowej populacji, co pozostaje w zgodzie z dotychczasowymi doniesieniami literaturowymi. Autor wykazał asocjacje wariantów polimorficznych w genach *CAPN9*, *OSM* i *ITGAM*. Warto podkreślić, że niektóre haplotypy *OSM* i *ITGAM* obniżały ryzyko wystąpienia wady, podczas gdy w przypadku *CAPN9* istotną rolę odgrywała interakcja z płcią zwierząt. Analizy transkryptomiczne wykazały zróżnicowanie ekspresji zależne od rodzaju tkanki i pozwoliły wskazać szereg genów potencjalnie zaangażowanych w rozwój przepukliny, m.in. *MMP13*, *VIT*, *SIMI*, *METTL21C*, *PITX1* i *HOXA7*. Szczególnie cenne okazały się badania epigenetyczne, które ujawniły zmiany w metylacji DNA w genach kluczowych dla procesów rozwojowych i przebudowy macierzy pozakomórkowej. Obniżona

metylacja stwierdzona w *METTL21C*, *HOXA7* i *PITX1* korelowała z ich nadekspresją, natomiast w przypadku *TBX1* i *MMP13* wykazano wyższy poziom metylacji, odpowiadający obniżonej aktywności transkrypcyjnej. Autor skupił się przy tym na analizie regionów promotorowych, które odgrywają fundamentalną rolę w inicjacji transkrypcji. Takie podejście należy uznać za trafne i uzasadnione, choć jednocześnie zawężające pełny obraz regulacji epigenetycznej, zwłaszcza że coraz więcej badań wskazuje na rolę również elementów enhanserowych i metylacji w regionach kodujących genów. Na szczególne podkreślenie zasługuje gen *METTL21C*, w którym równocześnie wykazano nadekspresję, zmiany w metylacji oraz wariant regulatorowy w rejonie promotora, co czyni go kandydatem o wysokim znaczeniu w patogenezie wady. Brak istotnych zmian liczby kopii genów oraz brak różnic na poziomie białek sugerują natomiast, że kluczową rolę mogą odgrywać warianty regulatorowe i mechanizmy kontroli ekspresji. Wyniki te mają dużą wartość poznawczą, a równocześnie podkreślają potrzebę dalszych badań walidacyjnych w różnych populacjach świń, wskazując na możliwość praktycznego wykorzystania markerów genetycznych i epigenetycznych w programach hodowlanych.

Mocne strony i ograniczenia przedstawionej rozprawy

Autor w przekonujący sposób udokumentował, że zmiany w obrębie genów związanych z funkcjonowaniem tkanki łącznej i mięśniowej (m.in. *MMP13*, *VIT*, *ACAN*, *COL6A5*, *CAPN9*, *METTL21C*) odgrywają istotną rolę w patogenezie przepukliny pępkowej u świń. Wyniki te stanowią cenny wkład w lepsze zrozumienie molekularnych podstaw tej wady rozwojowej. Warto jednak zauważyć, że choć autor wskazuje na procesy ogólne, takie jak remodelowanie macierzy zewnątrzkomórkowej, metabolizm kolagenu czy różnicowanie tkanki mięśniowej, to ich znaczenie dla szerszych zagadnień biologii tkanki łącznej i mięśniowej zostało zarysowane jedynie w tle, a nie potraktowane jako pogłębiony wątek interpretacyjny. Rozwinięcie tego aspektu – poprzez podkreślenie, że badania nad przepukliną mogą stanowić model dla zrozumienia uniwersalnych mechanizmów rozwoju i patologii tkanki łącznej oraz mięśniowej – mogłoby dodatkowo wzmocnić uniwersalny wymiar rozprawy i podnieść jej wartość poznawczą.

Do najważniejszych mocnych stron pracy należy zaliczyć weryfikację znanych asocjacji w niezależnych grupach zwierząt, co znacząco podnosi wiarygodność uzyskanych wyników, a także szczegółową analizę ekspresji genów w precyzyjnie rozdzielonych tkankach pierścienia pępkowego, pozwalającą uchwycić różnice zależne od rodzaju tkanki. Istotnym walorem jest również uwzględnienie aspektów regulacji epigenetycznej, w tym wskazanie *METTL21C* jako potencjalnego kluczowego regulatora, oraz zastosowanie nowoczesnych i adekwatnych narzędzi bioinformatycznych. Należy jednak

podkreślić, że pewne ograniczenia pracy są typowe dla badań genetyczno-epigenetycznych u świń. Obejmują one przede wszystkim ograniczoną liczebność prób oraz brak w pełni zintegrowanego modelu łączącego dane dotyczące genotypu, metylacji DNA i transkryptomu u tych samych osobników. Z tego względu konieczne wydaje się przeprowadzenie dalszych badań walidacyjnych w różnych rasach i stadach, aby w pełni potwierdzić uniwersalność wskazanych markerów. W tym kontekście zasadne jest postawienie Autorowi pytań dotyczących możliwych kierunków uzupełnienia i rozwinięcia badań, i prośba o ustosunkowanie się do przedstawionych kwestii:

1. Czy Autor przeprowadził bądź planuje dalsze analizy obejmujące integrację uzyskanych danych w modelach obrazujących zależności pomiędzy genotypem, metylacją DNA, ekspresją genów i fenotypem?
2. Jak Autor ocenia możliwości realizacji dodatkowych testów funkcjonalnych, takich jak weryfikacja wariantów promotorowych w testach reporterowych lub zastosowanie systemu CRISPR-Cas9 w komórkach mięśniowych, by ocenić bezpośredni wpływ wariantów genów na poziom ich ekspresji?
3. Czy Autor zakłada dalszą walidację wyników w innych rasach świń oraz w zróżnicowanych warunkach środowiskowych, dla potwierdzenia ich uniwersalności?
4. Czy już na podstawie obecnych wyników możliwe jest opracowanie indeksu ryzyka genetycznego występowania tej wady rozwojowej u świń?
5. Jak Autor ocenia potencjalną przydatność takiego narzędzia w selekcji hodowlanej, także w odniesieniu do innych gatunków?

Sugestie dotyczące dalszych badań nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy, która wyróżnia się na tle innych prac doktorskich zakresem badań i poziomem analiz. Na szczególne wyróżnienie zasługują następujące aspekty:

1. **Nowatorskie podejście metodologiczne** – autor zastosował zintegrowane podejście *multi-omiczne*, obejmujące analizy genetyczne (SNP, CNV), transkryptomiczne (RNA-seq), epigenetyczne (metylacja DNA) oraz walidacje na poziomie białkowym (Western blot). Tego rodzaju kompleksowość i komplementarność metod badawczych nie jest często spotykana w dysertacjach doktorskich.
2. **Oryginalny wkład poznawczy** – wyniki przedstawione w pracy nie tylko potwierdziły wcześniej sugerowane asocjacje, ale też wskazały nowy gen kandydujący o szczególnym znaczeniu

regulacyjnym – *METTL21C*. Wykazanie jego roli w regulacji ekspresji w tym metylacji DNA stanowi ważny krok w zrozumieniu molekularnych mechanizmów sterujących rozwojem i procesami funkcjonalnymi tkanek ich znaczenie w rozwoju opisywanej wady rozwojowej.

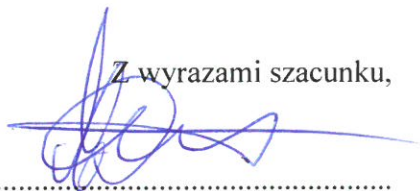
3. **Zastosowanie w praktyce hodowlanej** – przedstawione w rozprawie wyniki mają potencjał aplikacyjny, do opracowania narzędzi wspomagających selekcję hodowlaną, celem ograniczenia występowania przepukliny pępkowej i poprawy dobrostanu zwierząt.
4. **Wartość modelowa dla innych gatunków i medycyny człowieka** – choć autor w ograniczonym stopniu osadził wyniki w szerszym kontekście biologicznym. Wskazał jednak, że uzyskane dane mogą być istotne nie tylko w hodowli świń, lecz także jako modelowe w badaniach nad wadami tkanki łącznej i mięśniowej u innych gatunków zwierząt jak i ludzi.
5. **Staranność i spójność opracowania** – praca jest dobrze udokumentowana, logicznie skonstruowana i obejmuje bogaty materiał badawczy. Dyskusja opiera się na aktualnym stanie wiedzy i rzetelnie odnosi się do literatury światowej.

Konkluzja: Rozprawa charakteryzuje się wysokim poziomem merytorycznym, nowatorskim ujęciem tematu oraz wyraźnym potencjałem aplikacyjnym i translacyjnym. Spełnia wszystkie standardowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim, a jednocześnie wykracza poza ich typowy zakres dzięki kompleksowości badań i nowatorskim wnioskom.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Rozprawa doktorska mgr Jakuba Woźniaka spełnia wymagania określone w art. 187 ust. 1–4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2023 r., poz. 742 z późn. zm.). Praca jest oryginalna, metodologicznie poprawna i wnosi istotny wkład do zrozumienia opisywanego w pracy zagadnienia, ponadto otrzymane wyniki mają wyraźny potencjał aplikacyjny zarówno w hodowli zwierząt, jak i w kontekście badań modelowych.

Wnoszę o dopuszczenie mgr Jakuba Woźniaka do dalszych etapów postępowania doktorskiego. Jednocześnie, mając na uwadze nowatorski charakter pracy, szerokie ujęcie problematyki oraz złożoność przeprowadzonych analiz, wnoszę o wyróżnienie niniejszej rozprawy.

Z wyrazami szacunku,


Prof. dr hab. Mariusz Pierzchała