



**WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY
ŚRODOWISKA**

Uniwersytet Łódzki

Dr hab. Piotr Minias, prof. UŁ
Uniwersytet Łódzki
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
email: piotr.minias@biol.uni.lodz.pl

Wpłynęło do Dziekanatu
Wydziału Biologii UJ
w dniu

17 GRU. 2019

Łódź, dnia 10.12.2019 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Dudek

pt. „Geny głównego układu zgodności tkankowej (MHC): charakterystyka i introgresja u traszek z grupy *Lissotriton vulgaris*”

wykonanej w Zespole Genomiki i Ewolucji Eksperymentalnej

Instytutu Nauk o Środowisku

Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

pod opieką prof. dr. hab. Wiesława Babika i dr. Piotra Zielińskiego

Tematyka rozprawy

W swojej rozprawie doktorskiej, mgr Katarzyna Dudek postawiła sobie za cel scharakteryzowanie zmienności genów głównego układu zgodności tkankowej (ang. *Major Histocompatibility Complex*, MHC) w kompleksie traszek z rodzaju *Lissotriton*, obejmującym traszkę karpacką *L. montandoni* oraz kilka linii ewolucyjnych *L. vulgaris* klasyfikowanych do niedawna w obrębie pojedynczego gatunku, traszki zwyczajnej. Badania Doktorantki skupiły się na mechanizmie introgresji międzygatunkowej, czyli procesie, w którym następuje przepływ alleli danego genu między poszczególnymi gatunkami na drodze krzyżowania się. Hipoteza adaptacyjnej introgresja zakłada, że niektóre geny powinny ulegać częstszej introgresji niż inne, jeśli transfer nowych alleli w poprzek bariery międzygatunkowej może przynieść osobnikom drugiego gatunku przewagę selekcyjną. Takiej sytuacji można spodziewać się właśnie w przypadku genów MHC pozostających pod działaniem silnego doboru równoważącego, który

utrzymuje w populacjach ich wysoką zmienność genetyczną. Działanie doboru równoważącego opiera się na trzech podstawowych mechanizmach: przewagi heterozygot (naddominacji), doboru negatywnie zależnego od częstości oraz doboru fluktuującego. W zasadzie każdy z tych mechanizmów sprawia, że pojawienie się nowego, początkowo rzadkiego allelu MHC w populacji (np. na drodze introgresji) może być faworyzowane przez dobór. W efekcie, można się spodziewać, że geny MHC będą ulegać znacznie łatwiejszej introgresji niż większość pozostałych genów, których zmienność nie jest warunkowana poprzez działanie doboru równoważącego. Empiryczne przetestowanie tej hipotezy w obrębie kompleksu traszek z rodzaju *Lissotriton* było jednym z podstawowych celów badawczych rozprawy doktorskiej mgr Dudek. Trzeba jednak zauważyć, że testowanie hipotez związanych z procesami introgresji nie jest zadaniem łatwym, gdyż podobne wzory zmienności genetycznej mogą powstać na drodze innych mechanizmów, np. poprzez zachowanie ancestralnych polimorfizmów w niedawno rozdzielonych liniach ewolucyjnych bądź gatunkach. Stąd informacje o roli mechanizmu introgresji w kształtowaniu zmienności genetycznej populacji pokrewnych gatunków, w szczególności w rejonach stref mieszańcowych, są niezwykle skąpe. Dopiero w ostatnich latach zainteresowanie naukowe tym procesem nasila się, jednak w dalszym ciągu stan wiedzy w tym temacie jest zdecydowanie niezadawalający. W konsekwencji, tematyka badań podjętych przez mgr Dudek w ramach swojej rozprawy doktorskiej jest zdecydowanie nowatorska i dobrze ukonstytuowana na tle ewidentnych niedostatków obecnego stanu wiedzy w tym zakresie.

Wybór traszek z rodzaju *Lissotriton* do testowania powyższych hipotez jest również bardzo dobrze uzasadniony. Zasięg traszki karpackiej styka się z zasięgiem traszki zwyczajnej po obu stronach (wewnętrznej i zewnętrznej) łuku Karpat tworząc dwie łatwo wyróżnialne strefy mieszańcowe. Pozwala to na zebranie doskonałego materiału do wnioskowania o natężeniu procesu adaptacyjnej introgresji na drodze analizy zmienności genetycznej obu gatunków zarówno w samej strefie mieszańcowej (populacje syntopiczne), jak i w populacjach leżących w bezpośrednim sąsiedztwie oraz w pewnym oddaleniu od tej strefy (odpowiednio populacje parapatryczne i allopatryczne).

Struktura rozprawy i jej ocena formalna

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska to manuskrypt o standardowej strukturze liczący 103 strony, 33 rysunki i 21 tabel. Praca jest logicznie podzielona na dziesięć rozdziałów obejmujących streszczenia w języku polskim i angielskim, wstęp, cele pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję, informacje o dostępności danych, podziękowania i spis literatury. Oba streszczenia są klarowne i prezentują najważniejsze wyniki pracy wraz z ich interpretacją oraz zwięzłym wprowadzeniem

teoretycznym. Wstęp jest dość obszerny (15 stron) i stanowi bardzo dobre wprowadzenie do części wynikowej i dyskusyjnej pracy. W rozdziale tym Doktorantka szczegółowo, a jednocześnie w przystępny dla czytelnika sposób, opisuje strukturę genów i cząsteczek MHC, a także ich rolę w inicjowaniu odpowiedzi odpornościowej kręgowców. Odrębne podrozdziały wstępu poświęcone są mechanizmom warunkującym ewolucję genów MHC, przeglądowi informacji o strukturze regionu MHC u płazów, procesowi introgresji, charakterystyce badanych taksonów, a także problemom związanym z genotypowaniem MHC u organizmów niemodelowych. Choć wartość merytoryczną wstępu oceniam wysoko, w kilku miejscach tego rozdziału pojawiają się stwierdzenia, które w mojej ocenie wymagają doprecyzowania. Dla przykładu, na stronie 10 Doktorantka pisze, że „zazwyczaj MHC klasy I jest bardziej różnorodny niż MHC klasy II” nie podając żadnego odniesienia do materiałów źródłowych. Z kolei u niektórych grup kręgowców (np. u ptaków niewróblowych) MHC klasy II wykazuje znacznie wyższy poziom polimorfizmu niż MHC klasy I, więc stwierdzenie Doktorantki wydaje się nadmierną generalizacją.

Wartościowym elementem w strukturze rozprawy jest wyróżnienie celów pracy w postaci oddzielnego rozdziału, co stanowi dla czytelnika użyteczną mapę do poruszania się po kolejnych rozdziałach rozprawy. Materiały i metody, w szczególności protokoły laboratoryjne i analizy bioinformatyczne, opisane są skrupulatnie i szczegółowo, umożliwiając replikację badań. Rozdział wyników jest najobszerniejszym rozdziałem liczącym 35 stron i logicznie podzielonym na podrozdziały odpowiadające poszczególnym celom badawczym, choć moim zdaniem najbardziej rozbudowane tabele (np. Tabelę 17 zajmującą sześć stron) warto było zamieścić w postaci załącznika, a nie w głównej części wynikowej. Dyskusja jest relatywnie krótka (7 stron), ale wystarczająca, aby zinterpretować wyniki na tle istniejącej wiedzy oraz wyprowadzić płynące w nich wnioski. Cytowane prace są poprawnie dobrane, a całość bibliografii jest obszerna i liczy aż 181 niemal wyłącznie anglojęzycznych pozycji literaturowych. Z wyjątkiem kilku drobnych błędów edycyjnych (np. brak poprawnych cytowań na stronie 46 czy zduplikowana pozycja Flajnik (2018) w spisie literatury), tekst rozprawy nie budzi zastrzeżeń pod względem stylistycznym, ani formalno-językowym.

Ocena merytoryczna

Rozprawa doktorska mgr Katarzyny Dudek obejmuje trzy podstawowe cele badawcze. Pierwszy z nich dotyczył szczegółowej charakteryzacji genów MHC klasy I i II u traszek z rodzaju *Lissotriton*. Pionierskie badania regionu MHC u traszek skupiały się wcześniej na gatunkach klasyfikowanych obecnie do dwóch innych rodzajów, *Triturus* (traszka grzebieniasta) oraz *Ichthyosaura* (traszka górską). Obejmowały one

przede wszystkim charakterystykę polimorfizmu egzonu 2 MHC klasy II, odpowiedzialnego za kodowanie miejsc wiążących antygen. W późniejszych latach zmienność tego samego egzonu scharakteryzowano również u traszek z rodzaju *Lissotriton*, jednak rozprawa doktorska mgr Dudek stanowi doskonałe uzupełnienie wyników tych badań. Po pierwsze, badania prowadzone w ramach niniejszej pracy doktorskiej skupiły się nie tylko na genach MHC klasy II, ale również klasy I, które jak dotychczas (zgodnie z moją wiedzą) nie zostały scharakteryzowane u traszek. Co więcej Doktorantka po raz pierwszy scharakteryzowała całe sekwencje kodujące cząsteczki MHC obu klas, nie ograniczając się jedynie do sekwencjonowania pojedynczych egzonów. Tak postawiony cel badawczy wymagał opracowania nowatorskiego podejścia metodycznego, gdzie startery do amplifikacji docelowych sekwencji zostały zaprojektowane *de novo* w oparciu o istniejący transkryptom referencyjny traszek z rodzaju *Lissotriton*. Następnie pełne sekwencje kodujące amplifikowano z wykorzystaniem komplementarnego DNA nie zawierającego intronów, które otrzymywano poprzez przepisanie wyizolowanego mRNA. Sekwencje transkryptów uzyskano na drodze tradycyjnego klonowania. Na podstawie transkryptomów Doktorantka zaprojektowała również startery do amplifikacji jednego z dwóch egzonów (egzon 2) kodujących miejsca wiążące antygen w cząsteczce MHC klasy I. Startery amplifikujące egzon 2 MHC klasy II zostały zaprojektowane z wykorzystaniem techniki „genome walking”, bazując na opracowanych wcześniej sekwencjach starterowych amplifikujących relatywnie krótki fragment egzonu. Sekwencje alleli MHC obu klas zostały uzyskane z wykorzystaniem sekwencjonowania następnej generacji techniką Illumina. Allele uzyskane na podstawie sekwencjonowania genomowego DNA porównano z allelami uzyskanymi na podstawie analiz komplementarnego DNA, co posłużyło do identyfikacji alleli o niskiej ekspresji (allele nieklasyczne lub pseudogeny). W końcu, analiza alleli MHC w obrębie dwóch rodzin otrzymanych poprzez krzyżowanie traszki zwyczajnej i karpackiej umożliwiła uzyskanie haplotypów MHC, określenie minimalnej liczby loci przypadającej na haplotyp, oraz oszacowanie tempa replikacji i lokalizację regionów MHC obu klas na mapie genetycznej.

Podsumowując tę część badań, jestem pod bardzo dużym wrażeniem różnorodności i zaawansowania wykorzystanych przez Doktorantkę metod i technik, zarówno laboratoryjnych, jak i bioinformatycznych. Przeprowadzone prace z pewnością wykraczają daleko poza standardowe procedury charakteryzowania polimorfizmu MHC u organizmów niemodelowych. Co więcej, postawione sobie przez Doktorantkę cele badawcze wymagały niezwykle kreatywnego podejścia i autorskiego opracowania skomplikowanej metodologii, która umożliwiła skuteczną realizację tychże celów. Trzeba tutaj podkreślić, że genotypowanie MHC u organizmów modelowych jest często niezwykle trudne, zarówno ze względu na liczne duplikacje genów, niewielką wiedzę o organizacji genomowej regionu MHC, a także z powodu częstego braku referencyjnych zasobów genetycznych w

postaci złożonych genomów lub transkryptomów. Stąd jedynie dla bardzo nielicznych gatunków kręgowców charakteryzujących się niewielką liczbą loci MHC istnieją zestawy starterów umożliwiające amplifikację poszczególnych loci. W innych przypadkach, różne loci MHC amplifikowane są zbiorowo przy pomocy jednego lub kilku zestawów starterów, a następnie genotypowane z wykorzystaniem technik sekwencjonowania następnej generacji. Jednak nawet w takich przypadkach często możliwe jest wykorzystanie istniejących sekwencji starterowych od pokrewnych gatunków bądź silnie zdegenerowanych sekwencji amplifikujących geny MHC u szerokiego spektrum gatunków. Korzystanie z tych ułatwień niesie jednak za sobą pewne niebezpieczeństwa, np. specyficzną amplifikację jedynie niektórych loci albo alleli. W swojej pracy Doktorantka z tego rodzaju ułatwień nie korzystała, co świadczy o jej ambitnym podejściu do prowadzonych badań. Takie podejście zaowocowało uzyskaniem bardzo szczegółowej charakterystyki regionu MHC u traszek z rodzaju *Lissotriton* na bardzo różnych poziomach organizacji (zmienności nukleotydowej egzonu 2, różnorodności alleli, organizacji haplotypowej, etc.). Wydaje się, że na skutek badań przeprowadzonych w ramach przedłożonej mi do oceny rozprawy doktorskiej, traszkę zwyczajną i karpacką można zaliczyć do gatunków o najlepiej poznanej zmienności i strukturze regionu MHC wśród płazów.

Mimo mojej pozytywnej oceny tej części pracy, muszę przyznać, że z pewną nieufnością podchodzę do analizy ekspresji alleli MHC przy zastosowanym przez Doktorantkę podejściu metodycznym. Poziom ekspresji sprawdzono na względnie niewielkiej próbie 13 osobników, dla których dostępne były dane transkryptomowe. W zależności od liczby zmapowanych odczytów RNAseq allele MHC podzielono arbitralnie na trzy kategorie o niskiej, średniej i wysokiej ekspresji. Następnie allele te połączono w klastry genetyczne z pozostałymi allelami (pochodzącymi od osobników, dla których dane transkryptomowe nie były dostępne) i o poziomie ekspresji wnioskowano na podstawie przynależności do poszczególnych klastrów. W mojej ocenie takie podejście jest dość mocno uproszczone i może powodować błędy w identyfikacji stopnia ekspresji poszczególnych alleli. Wydaje mi się również, że nie ma odpowiednio silnych przesłanek merytorycznych pozwalający bezpiecznie założyć, że wszystkie allele MHC o podobnej sekwencji (tworzące jeden klaster genetyczny) będą miały podobny stopień ekspresji. Jednocześnie należy pamiętać o tym, że ekspresja poszczególnych alleli może wykazywać duże różnice między tkankami, więc sztywna klasyfikacja alleli jako podlegających niskiej lub wysokiej ekspresji może nie odpowiadać skomplikowanemu obrazowi ich rzeczywistej ekspresji w organizmie. W końcu, zastanawiam się jakie przesłanki zadecydowały o wyborze jedynie egzonu 2 MHC klasy I do analiz, natomiast egzon 3, który również tworzy region wiążący antygeny, został pominięty. Dla przykładu u ptaków większość analiz polimorfizmu MHC klasy I bazuje wyłącznie na egzonie 3, który jak się powszechnie uważa, wykazuje w tej grupie wyższą zmienność niż egzon 2.


Drugi i trzeci cel badawczy, którymi mgr Dudek zajmowała się w ramach swojej pracy doktorskiej, związane są z procesem adaptacyjnej introgresji genów MHC u traszek *Lissotriton*. Pierwsza z hipotez zakłada, że geny MHC klasy I będą ulegać łatwiejszej introgresji niż losowo wybrane geny, których zmienność nie jest kształtowana przez dobór równoważący. W tym celu poddano analizie zróżnicowanie genów MHC i ponad 150 innych genów między trzema grupami geograficznymi traszki zwyczajnej i karpackiej. Doktorantka potwierdziła, że najmniejsze zróżnicowanie MHC wystąpiło między populacją północną traszki zwyczajnej i populacją traszki karpackiej, a nie między najbardziej spokrewnionymi grupami traszki zwyczajnej, podczas gdy miary zróżnicowania pozostałych genów odzwierciedlały pokrewieństwo między grupami. Wynik ten wskazywał na zwiększone tempo introgresji genów MHC klasy I w stosunku do średniej ogólnogenomowej. Podobna hipoteza testowana była uprzednio na tym samym modelu w odniesieniu do genów MHC klasy II, jednak w mojej opinii ta część rozprawy doktorskiej nie jest prostą replikacją wcześniejszych badań, które porównywały zróżnicowanie genów MHC do zróżnicowania niewielkiego zestawu loci mikrosatelitarnych. Obecna analiza ponad 150 losowo wybranych genów z pewnością daje dużo lepszy obraz ogólnogenomowej zmienności niż kilka loci mikrosatelitarnych, umożliwiając wiarygodniejsze porównania ze zróżnicowaniem genów MHC, a co za tym idzie, dużo precyzyjniejsze oszacowanie tempa introgresji. Jednocześnie, wielkość próby w rozprawie mgr Dudek została zwiększona do imponującej liczby niemal dwóch i pół tysiąca osobników pochodzących z 35 populacji, co znacznie zwiększa moc wnioskowania. Stąd, uważam, że analizy te są w pełni nowatorskie i wnoszą istotny wkład w zrozumienie procesu introgresji genów MHC.

Wydaje mi się, że druga z hipotez związanych z introgresją nie została przez Doktorantkę odpowiednio doprecyzowana. W rozdziale „Cele pracy” czytamy, że trzecim celem badawczym było „przetestowanie hipotezy o łatwiejszej introgresji genów MHC klasy I i II w dwóch strefach mieszańcowych, jakie traszka karpacka tworzy z dwiema liniami traszki zwyczajnej po obu stronach Karpat”. Nie wiadomo jednak w odniesieniu do czego proces introgresji genów MHC w obu strefach mieszańcowych powinien być łatwiejszy, czy w odniesieniu do innych genów, czy może w odniesieniu do innych populacji lub lokalizacji geograficznych. Wyjaśnień dostarczają jednak konkretne predykcje związane z testowaniem tej hipotezy. Doktorantka założyła, że wewnątrzgatunkowe zróżnicowanie MHC między dwoma transektami przebiegającymi w poprzek strefy mieszańcowej powinno być wyższe niż międzygatunkowe zróżnicowanie wewnątrz każdego transektu, co wskazywałoby na silną introgresję tych genów. Wewnątrz- i międzygatunkowe wzorce zróżnicowania MHC zostały porównane z wzorcami zróżnicowania ponad tysiąca innych genów i jasno wskazywały na szybsze tempo introgresji MHC w porównaniu do średniej ogólnogenomowej. W pełni zgadzam się z argumentacją Doktorantki, że wyniki te dają znacznie bardziej bezpośrednie potwierdzenie procesu introgresji genów MHC w

porównaniu do badań w dużej skali geograficznej (drugi cel pracy), stanowiąc ich logiczne uzupełnienie. Jednocześnie chciałbym podkreślić, że oba cele rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Dudek dotyczące procesu introgresji zostały w mojej opinii zaplanowane i zrealizowane w sposób wzorowy i, bez względu na wsparcie, które Doktorantka z pewnością otrzymała od zespołu, w którym realizowana była praca, wskazuje to na jej duże zaangażowanie naukowe. W efekcie, rozprawa doktorska mgr Dudek wnosi w mojej opinii istotny wkład w zrozumienie procesów adaptacyjnej introgresji i mechanizmów utrzymywania zmienności genetycznej na skutek hybrydyzacji.

Podsumowanie

Podsumowując, uważam, że rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Dudek spełnia wymogi stawiane przez Ustawę z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164, poz. 1365; z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228; z 2011 r. Nr 84, poz. 455) i na tej podstawie wnoszę o **dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

KIEROWNIK
Katedry Badania Różnorodności
Biologicznej, Dydaktyki i Bioedukacji

dr hab. Piotr Minias