



INSTYTUT OCHRONY PRZYRODY

POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Dr hab. Aleksandra Biedrzycka
al. Adama Mickiewicza 33, 31-120 Kraków
tel. 12 370-35-00
e-mail: sekretariat@iop.krakow.pl

Kraków, 08.02.2022

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Ewy Gabrieli Pikus pt.: „Rola głównego kompleksu zgodności tkankowej w procesach synurbizacji ptaków”.

1. Ocena konstrukcji pracy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem dr hab. Piotra Miniasa w Katedrze Badania Różnorodności Biologicznej, Dydaktyki i Bioedukacji Instytutu Ekologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Rozprawa ma formę spójnego tematycznie cyklu trzech artykułów anglojęzycznych, z których dwa pierwsze w momencie przyjęcia rozprawy do recenzji zostały zgłoszone do druku, natomiast ostatni jest już opublikowany w czasopiśmie PeerJ (Impact Factor 2,9 i 100 punktów zgodnie z wykazem czasopism naukowych Ministerstwa Edukacji i Nauki). Niepublikowane jeszcze artykuły zostały zgłoszone do czasopism Scientific Reports (IF 4,38 , 140 pkt) i Journal of Animal Ecology (IF 5,09, 140pkt). Wybór czasopism wskazuje, że poszczególne rozdziały dysertacji prezentują badania na wysokim poziomie naukowym, a opublikowane wyniki mają szansę dotrzeć do szerokiego grona badaczy.

2. Ocena udziału doktorantki w powstaniu poszczególnych publikacji

Rozprawa zawiera oświadczenia Autorki i pozostałych współautorów o wkładzie w powstanie poszczególnych prac.

1. Pikus, E., Minias, P. Using de novo genome assembly and high-throughput sequencing to characterize the Major Histocompatibility Complex in a non-model rallid bird, the Eurasian coot *Fulica atra*. Scientific Reports (praca zgłoszona do druku).

W pierwszej pracy Autorka deklaruje swój udział na 60% i dotyczy on wszystkich etapów powstawania pracy, jest tutaj, razem z promotorem, autorem korespondencyjnym.

W dwóch kolejnych pracach:

2. Pikus, E., Dunn, P., Minias, P. High MHC diversity does not confer fitness advantage in a wild bird. Journal of Animal Ecology (praca zgłoszona do druku) oraz
3. Pikus E., Włodarczyk, R., Jedlikowski, J., and Minias, P., 2021. Urbanization processes drive divergence at the major histocompatibility complex in a common waterbird. PeerJ, 9, p.e12264.

Udział Autorki to 50% i dotyczy on również wszystkich etapów powstawania manuskryptów. Pewne wątpliwości budzi fakt, że w przypadku żadnej z tych dwóch prac Autorka nie była osobą odpowiedzialną za korespondencję z czasopismem. Rola autora korespondencyjnego na pewno potwierdzałyby je dużą samodzielność.

Poza pracami wchodzącymi w skład rozprawy doktorskiej pani Ewa Pikus jest również współautorką sześciu prac opublikowanych na przestrzeni lat 2017-2021 z których większość dotyczy zmienności MHC w naturalnych populacjach ptaków i procesów tę zmienność kształtujących. Prace te opublikowane są w wysokoimpaktowych czasopismach. Dorobek Autorki świadczy o jej dużym zaangażowaniu i wysokim poziomie naukowym.

3. Ocena streszczenia będącego opracowaniem artykułów wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

Przedstawiony do oceny cykl publikacji poprzedzony jest krótkim streszczeniem w języku polskim i angielskim, a następnie obszernym, polskim omówieniem tła teoretycznego i wyników przeprowadzonych badań. Rozdział ten w przystępny sposób wprowadza czytelnika w tematykę, uzasadnia podjęcie tematu i jego znaczenie oraz opisuje metody, wyniki i konkluzje wynikające z przeprowadzonych badań. Rozdział ten zawiera, co niezwykle ważne, szczegółowo sformułowane cele pracy w odniesieniu do trzech prac wchodzących w skład rozprawy. Głównym celem pracy było określenie procesów kształtujących zmienność genów głównego kompleksu zgodności tkankowej w kontekście procesu urbanizacji. Geny MHC, przede wszystkim dzięki swojej niezwyklej zmienności oraz udowodnionego znaczenia w obronie przed patogenami, stały się modelowym układem do badania procesów kształtujących adaptacyjną zmienność genetyczną naturalnych populacji kręgowców. Ujęcie tematu zaproponowane przez Autorkę wydaje mi się niezwykle innowacyjne i potencjalnie dające szansę na uzyskanie nowych informacji zarówno na temat procesów kształtujących zmienność MHC jak i procesów ewolucyjnych zachodzących w populacjach zsynurbizowanych. Temat, jaki postawiła przed sobą Doktorantka jest ambitny. Badania zostały zaplanowane w sposób umożliwiający kompleksowe zbadanie zarówno zmienności genów MHC u niemodelowego gatunku jakim jest łyska, jak i czynników kształtujących tę zmienność w populacjach o różnym stopniu urbanizacji, a także wpływu zmienności na cechy związane z dostosowaniem.

W mojej ocenie może zbyt szczegółowo w streszczeniu zostały opisane mechanizmy związane z samym procesem urbanizacji. Wolalabym, żeby więcej uwagi poświęcić konkretnym, związanym z urbanizacją, mechanizmom, które mogą kształtować adaptacje osobników do zmian w siedlisku, szczególnie w kontekście genów związanych z odpornością. Przykładem jest tutaj akapit na stronie czwartej, w którym autorka podaje, że urbanizacja może wpływać negatywnie na występowanie naturalnych patogenów. Nie rozwija jednak tej myśli, nie dowiadujemy się więc jakie dokładnie czynniki ograniczają różnorodność patogenów w siedliskach miejskich. W tym samym akapicie Autorka wskazuje, że populacje miejskie mogą być w szczególny sposób narażone na dryf genetyczny i wynikające z niego obniżenie zmienności genetycznej. Niewątpliwie może się tak dzieć w niektórych przypadkach, ale jednocześnie istnieje wiele gatunków, których populacje miejskie cechują się większą liczebnością i łącznością niż populacje z obszarów pozamiejskich, co może skutkować wyższą, nie niższą, zmiennością genetyczną w porównaniu z populacjami z terenów niezurbanizowanych.

Szczegółową ocenę metod i uzyskanych wyników przedstawiam w kolejnym rozdziale, tutaj natomiast odnoszę się do dwóch kwestii, które zwróciły moją uwagę. Do amplifikacji 3 egzonu MHC klasy I użyto starterów zaprojektowanych dla ptaków szponiastych. Takie

podejście budzi moją wątpliwość, ponieważ może ono skutkować namnożeniem jedynie części alleli obecnych w locus, możliwe że będzie to jakaś szczególna grupa alleli, niekoniecznie ulegająca ekspresji. Jednocześnie, w ramach pierwszej przedstawionej publikacji autorzy wykonali sekwencjonowanie całego genomu łyski. Uzyskane w ten sposób dane pozwoliły na poznanie całej sekwencji MHC klasy I i II, których analiza zmienności mogła posłużyć do zaprojektowania specyficznych dla łyski starterów PCR. Do ich zaprojektowania mogły posłużyć również sekwencje tego regionu znane dla spokrewnionych gatunków i zdeponowane w ogólnodostępnych bazach. Co więcej, dysponując całą długością sekwencji MHC klasy I i II, można było się pokusić o sekwencjonowanie tego fragmentu dla wszystkich badanych osobników. Rozumiem, że tego rodzaju podejście znacząco zwiększyłoby koszty i czas realizacji projektu, z drugiej strony jednak bardzo podniosłoby jakość tego szeroko zakrojonego projektu.

Zastanawiam się również nad możliwością lepszego wykorzystania danych o zmienności ponad 14 tys. loci SNP niż tylko do porównania ich zmienności z potencjalnie podlegającą doborowi naturalnemu zmiennością MHC. Taki zestaw danych rzeczywiście daje bardzo dobre tło pozwalające ocenić działanie doboru na tle procesów demograficznych. Warto by było jednak spróbować wykorzystać te dane do uzyskania np. dokładniejszego wglądu w procesy demograficzne zachodzące w badanych populacjach. Na pewno może to być temat na kolejny manuskrypt.

4. Ocena artykułów wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

Pikus, E., Minias, P. Using de novo genome assembly and high-throughput sequencing to characterize the Major Histocompatibility Complex in a non-model rallid bird, the Eurasian coot *Fulica atra*. Scientific Reports (praca zgłoszona do druku).

W pierwszym manuskrypcie autorzy opisują architekturę całego regionu MHC klasy I i II u łyski, którą udało im się zbadać dzięki zsekwencjonowaniu genomu tego niemodelowego gatunku. Dodatkowo przedstawiają również dane o sekwencjach najbardziej zmiennych egzonów (trzeciego dla 3 MHC klasy I i drugiego dla MHC klasy II) dla dużej liczby osobników. Mimo, że artykuł ma charakter opisowy, to uzyskanie tego typu danych pozwoliło na zdecydowanie dokładniejsze określenie liczby loci w badanych genach oraz poziomu ich zmienności. Autorzy wykazali, że region MHC u łyski charakteryzuje się niespotykane wysokim poziomem duplikacji i wyższym poziomem polimorfizmu w regionie MHC w porównaniu z innymi gatunkami ptaków niewróblowych. Udało się również wykazać różnice w sile działania doboru naturalnego w obu klasach genów MHC na przestrzeni długiego czasu.

Autorzy zaprezentowali staranną dyskusję dotyczącą zarówno dużej liczby loci MHC u łyski, różnic w poziomie polimorfizmu między oboma klasami genów w odniesieniu do możliwej presji ze strony patogenów czy poziomu pseudogenizacji w badanym regionie. Wyniki zostały szczegółowo porównane z danymi dla innych gatunków. Mimo, że uzyskane wyniki wskazują na brak obecności pseudogenów, otwartym pozostaje pytanie jak wiele z wykrytych wariantów rzeczywiście ulega ekspresji. Badania przeprowadzone na ptakach wróblowych wskazują, że część z ogromnej liczby posiadanych przez nie wariantów MHC nie ulega ekspresji. Sprawdzenie tego dla gatunku z rzędu ptaków niewróblowych, ale

charakteryzującego się nieprzeciętnie wysokim poziomem duplikacji i polimorfizmu MHC mogłoby stanowić istotny wkład do odpowiedzi na pytanie o poziom zmienności i czynniki go kształtujące. W tym celu, można by wykorzystać sekwencje całych genów MHC obu klas uzyskane z sekwencjonowanego *de novo* genomu do zaprojektowania zestawu premierów zlokalizowanych w intronach. Następnie wykonać sekwencjonowanie genów MHC klasy I i II przy użyciu gDNA i cDNA dla kilku osobników łąski. W ten sposób można by było uzyskać pełniejszą informację o liczbie loci oraz poziomie ekspresji funkcjonalnych wariantów.

Oceniając powyższy manuskrypt nie wnikam w szczegóły dotyczące samego sekwencjonowania i składania genomu łąski, bo czuję, że nie miałbym tutaj wystarczających kompetencji. Co do szczegółów, że autorzy powinni zaznaczyć, że przeprowadzone przez nich testy doboru naturalnego dotyczą jedynie presji działającej historycznie i należy ją odróżnić od sił selekcyjnych działających obecnie. Podając liczbę miejsc będących pod doбором (Tabela 2.) warto by było zaznaczyć do jakiego stopnia miejsca wykryte przy pomocy różnych testów pokrywały się ze sobą. Nie jestem również pewna dlaczego porównanie zmienności MHC uzyskane dla całych genów i tylko pojedynczych egzonów (Tabela 1) w przypadku MHC klasy II jest przedstawione jedynie dla egzonu 2.

Pikus, E., Dunn, P., Minias, P. High MHC diversity does not confer fitness advantage in a wild bird. *Journal of Animal Ecology* (praca zgłoszona do druku)

Celem kolejnego artykułu było poszukiwanie związku pomiędzy indywidualną zmiennością MHC klasy I i II a cechami związanymi z dostosowaniem w miejskich populacjach łąski. Artykuł prezentuje bardzo ciekawe podejście, badania związku zmienności MHC z dostosowaniem były do tej pory prowadzone rzadziej niż te badające związek z poziomem infekcji i często prezentowały sprzeczne wnioski. W swojej pracy autorzy prezentują imponujący zbiór danych, zebranych w okresie 10 lat i zawierających informacje o sukcesie reprodukcyjnym, a zmienność MHC porównują ze zmiennością całogenomową. Otrzymane wyniki przeczą często opisywanym pozytywnym zależnościom między zmiennością genów MHC a kondycją osobników czy cechami związanymi z dostosowaniem. Autorzy wykazali negatywny związek między różnorodnością alleli MHC a kondycją i sukcesem rozrodczym oraz poziomem ekspresji ornamentów seksualnych. Tego rodzaju wyniki na pewno wnoszą dużo do dyskusji o powodach i znaczeniu zmienności MHC, widzę jednak w pracy kilka nieścisłości dotyczące zarówno części metodycznej, jak i wyników i ich interpretacji, które w mojej ocenie powinny zostać poprawione.

Jak już wspominałam wcześniej, zaprojektowanie specyficznych primerów PCR dla MHC klasy I zdecydowanie uwiarygodniłoby wyniki. Jeżeli istnieje podejrzenie, że nie wszystkie allele MHC uległy amplifikacji trudno ocenić wpływ różnorodności allelicznej na cechy związane z dostosowaniem.

Autorzy nie przedstawiają bezpośrednich dowodów na to, że rozmiar blaszki czołowej u łąski rzeczywiście wskazuje na dominującą pozycję. Biorąc pod uwagę, że jest to jedyna cecha będąca ornamentem seksualnym trudno uznać, że autorom udało się udowodnić związek różnorodności MHC z takim sposobem wyrażenia jakości osobników.

Autorzy badają szereg cech, które powinny wykazywać związek z różnorodnością wariantów MHC. Wiadomo jednak, że wszystkie teorie tłumaczące różnorodność tych genów odnoszą się do presji patogenów wywieranej na gospodarzy. Dlatego brakuje mi w tej pracy, jeśli nie bezpośrednich analiz, to przynajmniej scharakteryzowania presji pasożytniczej jaka

występuje w badanej populacji. Z resztą, wg ogólnych informacji zawartych w pracy, populacja miejska powinna charakteryzować się obniżoną presją patogenów. Tymczasem autorzy argumentują, że negatywne zależności, które udało im się wykazać mogą być dowodem na teorię mówiącą, że zbyt duża różnorodność wariantów MHC może być niekorzystna ze względu na jej wpływ na ograniczanie różnorodności receptorów TCR, co z kolei negatywnie wpływa na rozpoznawanie kompleksów MHC-peptyd. W sytuacji gdy mamy do czynienia z obniżoną presją patogenów tego rodzaju trade-off nie powinien mieć wielkiego znaczenia.

Zastanawiam się również, czy badając tego rodzaju zależności na przestrzeni 10 lat nie należałoby sprawdzić czy frekwencje supertypów MHC nie zmieniają się istotnie w czasie, co świadczyłoby o działaniu doboru w krótkiej skali czasowej, ale jednocześnie nie pozwoliłoby traktować całości danych łącznie.

Wyniki wskazują na wiele korelacji pomiędzy np. konkretnym supertypem a kilkoma cechami określającymi dostosowanie. Podejrzewam, że wynika to z wzajemnej korelacji między tymi właśnie cechami. Warto by było wyjaśnić to w tekście.

W końcu, autorzy dowodzą negatywnej zależności między różnorodnością MHC a cechami określającymi dostosowanie. Tymczasem nie udało się wykazać takiego związku dla liczby wyklutych piskląt, co jest właściwie cechą najlepiej określającą dostosowanie. W tej sytuacji uważam, że należałoby trochę przeformułować konkluzje, a może nawet tytuł pracy.

Praca zawiera również drobne nieścisłości merytoryczne czy wymagające poprawy sformułowania i nieliczne błędy językowe, które niewątpliwie zostaną skorygowane przed przyjęciem jej do druku.

Pikus E., Włodarczyk, R., Jedlikowski, J., and Minias, P., 2021. Urbanization processes drive divergence at the major histocompatibility complex in a common waterbird. *PeerJ*, 9, p.e12264.

Ostatnia praca, opublikowana w *PeerJ*, bezpośrednio odnosi się do wpływu procesów urbanizacji na zmiany poziomu różnorodności i składu puli genowej MHC. Autorzy porównali zmienność MHC klasy I i II pomiędzy populacjami zamieszkującymi siedliska o różnym stopniu urbanizacji; dwie populacje miejskie założone odpowiednio około 70 i 20 lat temu oraz dwie populacje zamieszkujące tereny nieurbanizowane. Założyli, że kolonizacja terenów miejskich powinna wiązać się ze zmniejszoną różnorodnością w regionie MHC spowodowaną przez czynniki demograficzne lub lokalną adaptację. Aby rozróżnić te dwa mechanizmy porównali zmienność MHC ze zmiennością neutralną w dziewięciu loci mikrosatelitarnych. Otrzymane wyniki wskazują na widoczną w MHC istotną dywergencję pomiędzy miejskimi i pozamiejskimi populacjami, podczas gdy nie wykazano różnic między dwoma populacjami pozamiejskimi. Jednocześnie różnice międzypopulacyjne w loci mikrosatelitarnych nie wykazały istotnego zróżnicowania. Obie populacje miejskie charakteryzowały się niższą różnorodnością alleliczną niż populacje pozamiejskie. Jednocześnie różnice te nie były widoczne w loci mikrosatelitarnych, co wskazuje na działanie doboru naturalnego w kształtowaniu zmienności MHC populacji miejskich i pozamiejskich.

Przedstawione wyniki wskazują na wpływ samego procesu urbanizacji a także czasu jaki upłynął od założenia populacji miejskiej na poziom zmienności MHC, co z kolei wskazuje na adaptację populacji miejskich do specyficznych warunków siedliska. Artykuł jest napisany w sposób klarowny, a zastosowane metody analizy danych są odpowiednie do testowania

założonych hipotez. Pewne wątpliwości budzi natomiast sposób zaplanowania eksperymentu, chociaż do razu zaznaczam, że Autorzy są świadomi ograniczeń pracy i szczegółowo je dyskutują w artykule.

Mimo, że uzyskanie wyników wskazuje na różnice w poziomie zmienności i składzie alleli MHC pomiędzy populacjami o różnym stopniu urbanizacji, to aby wskazać mechanizmy, które je powodują należałoby rozszerzyć układ badanych populacji. W badaniach należałoby uwzględnić przynajmniej po dwie populacje danego typu (czyli „stare” i „nowe” miejskie oraz pozamiejskie populacje). Pozwoliłoby to na sprawdzenie powtarzalności zachodzących mechanizmów. Poza tym, „stara” populacja miejska zlokalizowana jest zdecydowanie dalej od pozostałych i nie można wykluczyć, że jej odmiennosc pod względem składu alleli MHC jest spowodowana częściowo właśnie przez ten nierównomierny dystans. Mimo, że zmienność loci mikrosatelitarnych nie wskazuje na istotne zróżnicowanie między populacjami łyski, to nie do końca można przewidzieć jak kształtowałyby się zróżnicowanie międzypopulacyjne przy równomiernie zaplanowanym dystansie między nimi.

Podobnie jak w przypadku poprzedniego manuskryptu, znajomość danych na temat presji pasożytów w badanych populacjach pozwoliłaby być może wskazać na dokładne mechanizmy powodujące różnice w poziomie zmienności MHC między populacjami o różnym stopniu synurbizacji. Zasadnicza część dyskusji dotyczy znaczenia zmienności MHC w kontekście obrony przed patogenami i prawdopodobnym ograniczeniu ich presji w środowisku miejskim, co może tłumaczyć mniejszą zmienność MHC w takich populacjach. Jednak bez znajomości choćby składu fauny pasożytniczej atakującej populację łyski nie można odpowiedzieć na pytanie czy zróżnicowanie MHC między populacjami wynika z różnych lokalnych adaptacji, czy na przykład z faktu, że tylko mogące sobie poradzić z tą presją osobniki (a więc posiadające odpowiednie warianty MHC) były w stanie założyć populacje miejskie.

Niezależnie jednak od opisanych powyżej zastrzeżeń uważam, że praca przynosi wartościowe wyniki i pozwala zaprojektować dalsze badania, które mają szansę odpowiedzieć na pytanie jakie mechanizmy kształtują zmienność genów związanych z odpornością w populacjach zurbanizowanych i do jakiego stopnia adaptacje w tych rejonach genomu mają znaczenie dla dostosowania do środowiska miejskiego.

5. Konkluzja

Podsumowując, chcę zaznaczyć, że bardzo wysoko oceniam pracę Pani mgr Ewy Pikus. Aby zrealizować postawione sobie cele Autorka, wraz ze współpracownikami, wykonała olbrzymią pracę terenową, w której pobrano próby od imponującej liczby osobników łyski, a co więcej pozyskano dane dotyczące ich kondycji i sukcesu reprodukcyjnego. Jednocześnie Autorka zastosowała wyrafinowane metody molekularne i bioinformatyczne aby uzyskać dokładne dane o architekturze regionu MHC u badanego gatunku.

Doktorantce udało się zrealizować cele, które przed sobą postawiła. Przedstawione badania zmienności genów MHC w kontekście synurbizacji populacji łyski są niewątpliwie innowacyjne i dostarczają, nowych, szczegółowych i istotnych informacji, które wpisują się w ciągle żywą dyskusję na temat mechanizmów kształtujących zmienność tego regionu i jego rolę w naturalnych populacjach kręgowców.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny praca spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim przez ustawę o stopniach naukowych i tytule naukowym i wnioskuję o dopuszczenie Pani magister Ewy Pikus do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Helena Bielecka