



WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY
ŚRODOWISKA

Uniwersytet Łódzki

Łódź, dnia 10.05.2019 r.

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

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Migalskiej

pt. „MHC genes copy number and TCR repertoire size in the bank vole: diversity, selection and the optimality hypothesis”

wykonanej w Pracowni Biologii Ewolucyjnej

Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

pod kierunkiem prof. dr. hab. Jacka Radwana

Tematyka rozprawy

Rozprawa doktorska mgr Magdaleny Migalskiej skupia się na zagadnieniach związanych z mechanizmami warunkującymi zmienność głównego układu zgodności tkankowej (ang. *Major Histocompatibility Complex, MHC*) w kontekście ewolucyjnym. Doktorantka za główny cel badawczy postawiła sobie przetestowanie hipotezy optymalności, która wskazuje na istnienie kompromisu ewolucyjnego między liczbą genów MHC a różnorodnością limfocytów T. Hipoteza ta zakłada, że nadmierna duplikacja genów MHC niesie ze sobą określone koszty na poziomie osobniczym, co może tłumaczyć obecność relatywnie niewielkiej liczby funkcjonalnych loci MHC u wielu gatunków kręgowców. Mechanizm, który leży u podstaw hipotezy optymalności zakłada, że rosnąca liczba wariantów allelicznych MHC może powodować ograniczenie repertuaru receptorów limfocytów T (ang. *T cell receptors, TCR*) na drodze negatywnej selekcji grasiczej. Z drugiej jednak strony, większa liczba genów MHC poddawanych ekspresji na poziomie osobniczym może zwiększać pulę limfocytów T wyłanianych w procesie selekcji pozytywnej. Mimo, że hipoteza optymalności została pierwotnie

sformułowana niemal trzy dekady temu, jej podstawowe założenia (związek liczby wariantów MHC z wielkością repertuaru TCR) w zasadzie nie zostały przez te wszystkie lata poddane bezpośredniemu testowaniu. Uzupełnienie tej istotnej luki było podstawowym celem rozprawy doktorskiej Pani mgr Migalskiej.

Jako model badawczy Doktorantka wybrała nornicę rudą *Myodes glareolus*, gatunek niewielkiego gryzonia coraz częściej wykorzystywanego w badaniach eksperymentalnych. Taki wybór obiektu do badań podyktowany był z jednej strony łatwością w pozyskaniu materiału badawczego (do badań wykorzystano tkanki pochodzące z laboratoryjnej hodowli Instytutu Nauk o Środowisku Uniwersytetu Jagiellońskiego), ale także wcześniej udokumentowanym faktem istnienia dużej indywidualnej zmienności liczby wariantów allelicznych MHC klasy II u tego gatunku. Z drugiej strony, Doktorantka nie dysponowała wcześniejszymi informacjami dotyczącymi zmienności genów MHC klasy I, odpowiadającymi za wiązanie i prezentowanie antygenów pochodzących od patogenów wewnątrzkomórkowych. Opracowanie metodyki genotypowania oraz scharakteryzowanie genów MHC klasy I u nornicy rudej było punktem wyjścia do dalszych badań i stanowiło cel pierwszej z trzech prac naukowych będących podstawą rozprawy doktorskiej mgr Migalskiej. Drugim komponentem, który należało scharakteryzować, aby móc przetestować założenia hipotezy optymalności była zmienność receptorów TCR. Opracowanie metodyki genotypowania oraz wstępna charakterystyka zmienności i wielkości repertuaru receptorów TCR były tematem drugiej z opublikowanych prac. Celem trzeciej, kluczowej w mojej ocenie pracy, było bezpośrednie przetestowanie podstawowych założeń hipotezy optymalności, bazując na modelu nornicy rudej i wykorzystując metodykę opracowaną w trakcie wcześniejszych prac badawczych.

Struktura rozprawy i jej ocena formalna

Rozprawa doktorska mgr Magdaleny Migalskiej składa się z dwóch zasadniczych części. Pierwszą część rozprawy stanowią streszczenia w języku polskim i angielskim. W streszczeniach tych Doktorantka zawarła obszerne wprowadzenie teoretyczne do problemów badawczych, które stanowią podstawę prezentowanych prac naukowych. Doktorantka w sposób klarowny scharakteryzowała strukturę oraz podstawowe mechanizmy immunologiczne związane z funkcjonowaniem kompleksu MHC, skupiając się w szczególności na procesie prezentowania antygenów. Jednocześnie przedstawiła szczegółowo mechanizmy warunkujące interakcje między cząsteczkami MHC a receptorami TCR, które inicjują swoistą reakcję układu odpornościowego. W końcu, Doktorantka wprowadziła kluczową z punktu widzenia badań prezentowanych w rozprawie hipotezę optymalności. Hipotezy i cele badawcze zostały

poprawnie sformułowane i jasno opisane. Streszczenia zawierają także podsumowanie wyników każdej z trzech prac naukowych stanowiących podstawę rozprawy oraz ich zwięzłą interpretację. Ta część rozprawy kończy się spisem źródeł literaturowych wykorzystanych w streszczeniu (ok. 50 wyłącznie anglojęzycznych pozycji). Tekst streszczeń wraz ze spisem literatury obejmuje prawie 20 stron maszynopisu i nie budzi zastrzeżeń pod względem stylistycznym, ani formalno-językowym.

Drugą, zasadniczą część rozprawy doktorskiej, stanowią kopie trzech następujących publikacji naukowych wraz z materiałami dodatkowymi (ang. *supplementary materials*):

1. Migalska, M., Sebastian, A., Konczal, M., Kotlík, P. & Radwan, J. 2017. *De novo* transcriptome assembly facilitates characterisation of fast-evolving gene families, MHC class I in the bank vole (*Myodes glareolus*). *Heredity* 118: 348–357.
2. Migalska, M., Sebastian, A. & Radwan, J. 2018. Profiling of the TCR β repertoire in non-model species using high-throughput sequencing. *Scientific Reports* 8: 11613.
3. Migalska, M., Sebastian, A. & Radwan, J. 2019. Major histocompatibility complex class I diversity limits the repertoire of T cell receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA (PNAS)* 116: 5021–5026

Prace te zostały opublikowane w latach 2017–2019 w międzynarodowych anglojęzycznych czasopismach z listy *Journal Citation Index (JCR)* o wskaźniku *Impact Factor* od 3.87 do 9.50. Mimo, że z zasady merytoryczna wartość prac naukowych nie powinna być oceniana przez pryzmat wskaźników bibliometrycznych samego czasopisma, w którym dana praca się ukazuje, to należy zwrócić uwagę, że wysoka ranga czasopisma jest często powiązana z wysoką jakością recenzji naukowej. W tym kontekście, na szczególną uwagę zasługuje publikacja w *PNAS*, które jest jednym z wiodących interdyscyplinarnych czasopism naukowych na świecie. Nie ma najmniejszej wątpliwości, że manuskrypty składane w redakcjach tego rodzaju czasopism podlegają bardzo silnej selekcji pod kątem nie tylko wysokiego standardu naukowego, ale także nowatorstwa badań oraz możliwości zainteresowania prezentowanymi wynikami szerokich kręgów środowiska naukowego.

Końcowym, ale niezwykle ważnym, elementem rozprawy doktorskiej są oświadczenia o wkładzie poszczególnych autorów w powstanie prac naukowych. Z analizy tych oświadczeń jednoznacznie wynika, że udział Doktorantki w powstanie wszystkich trzech prac był wiodący. We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, a w dwóch z nich także autorem korespondencyjnym, natomiast jej całkowity wkład został oszacowany na 55–70%. Warto podkreślić, że zgodnie z oświadczeniami, Doktorantka aktywnie uczestniczyła w niemal wszystkich etapach

procesu badawczego prowadzącego do powstania publikacji naukowych, a jej wkład został wykazany zarówno w sferze planowania badań, w pracach laboratoryjnych, w analizach statystycznych i bioinformatycznych, a także w interpretacji uzyskanych wyników oraz pisaniu samych artykułów. Bezsparnie świadczy to o dużej samodzielności naukowej i wszechstronności Doktorantki.

Ocena merytoryczna

Z pełnym przekonaniem i nie bez przyjemności muszę stwierdzić, że jakość naukowa rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Migalskiej stoi w mojej ocenie na bardzo wysokim, z pewnością ponadprzeciętnym poziomie. Decyduje o tym kilka kluczowych cech prezentowanej rozprawy. Pierwszym z nich jest wysokie nowatorstwo nie tylko uzyskanych wyników, ale także warsztatu metodycznego wykorzystanego w pracy. Cel, który postawiła sobie mgr Migalska był bardzo ambitny. Zakładał on przetestowanie ważnej z ewolucyjnego punktu widzenia hipotezy, która do tej pory miała ograniczone ugruntowanie empiryczne. Należy tutaj podkreślić, że nie bez przyczyny mechanizm leżący u podstaw hipotezy optymalności nie został wcześniej poddany gruntownym badaniom eksperymentalnym – takie badania wymagają nie tylko szczegółowego przygotowania teoretycznego zarówno na poziomie procesów immunologicznych jak i genetycznych, ale także dobrej znajomości zaawansowanych technik laboratoryjnych i bioinformatycznych, daleko wykraczających poza metodykę stosowaną w standardowych badaniach molekularnych. Postawiony sobie przez Doktorantkę cel badawczy wydaje się jeszcze bardziej ambitny w odniesieniu do obranego obiektu badań, nornicy rudej, która z pewnością nie może zostać uznana za wszechstronnie poznany gatunek modelowy. Stworzyło to konieczność kreatywnego zaadaptowania metodyki opracowanej dla organizmów modelowych (np. myszy lub człowieka) bądź też opracowanie autorskich ścieżek metodycznych niezbędnych do zrealizowania postawionych sobie celów. Doskonałym przykładem takiego podejścia, a także pewnym unaocznieniem stopnia skomplikowania problemów metodycznych z którymi musiała się zmierzyć w swoich badaniach Doktorantka, są dwie pierwsze z prac tworzących rozprawę doktorską.

Celem pierwszej pracy (*Heredity*) było scharakteryzowanie zmienności genów MHC klasy I u nornicy rudej, jednak standardowe zastosowanie technik sekwencjonowania nowej generacji nie było możliwe ze względu na brak opisanych sekwencji starterowych. Problem ten został rozwiązany poprzez wykorzystanie transkryptomów nornicy, które posłużyły do zaprojektowania odpowiednich starterów. Wykorzystanie składanych *de novo* transkryptomów do projektowania sekwencji starterowych dla genów MHC jest nie tylko nowatorskie, ale ma też dodatkową zaletę, gdyż umożliwia genotypowanie

jedynie tych loci, które są poddane ekspresji, z wyłączeniem loci niefunkcjonalnych (pseudogenów), często występujących w rejonie MHC. Zastosowanie takiej metody przez Doktorantkę umożliwiło jej skuteczne scharakteryzowanie zmienności genów MHC klasy I u nornicy rudej, a także analizę tempa synonimicznych i niesynonimicznych podstawień nukleotydów. To z kolei umożliwiło określenie zestawu kodonów noszących ślady wpływu doboru pozytywnego (różnicującego), które zgodnie z teorią powinny tworzyć rowek cząsteczki MHC bezpośrednio odpowiadający za wiązanie antygenów. Wydaje się, że metodyczne podejście zaproponowane przez Doktorantkę wraz ze współautorami ma szansę stać się w przyszłości jedną ze standardowych technik genotypowania MHC u gatunków niemodelowych, u których gatunkowo-specyficzne sekwencje starterowe do amplifikacji MHC nie są jeszcze znane.

Z jeszcze poważniejszymi wyzwaniami metodycznymi Doktorantka zmierzyła się w drugiej pracy (*Scientific Reports*) stanowiącej podstawę rozprawy doktorskiej. Jej celem było scharakteryzowanie zmienności regionu CDR3 kodującego część cząsteczki TCR biorącą bezpośredni udział w rozpoznawaniu antygenów prezentowanych przez MHC, a także oszacowanie wielkości repertuaru receptorów TCR u nornicy rudej. Jak dotychczas tego rodzaju badania prowadzone były na wąskiej grupie gatunków modelowych o istotnym znaczeniu klinicznym lub gospodarczym. W ramach pracy Doktorantka nie tylko wypracowała uproszczony protokół genotypowania receptorów TCR bazujący na technikach sekwencjonowania o wysokiej przepustowości (Illumina), ale również wraz ze współautorami pracy stworzyła i upubliczniła bioinformatyczne narzędzia do analizy tego rodzaju danych. Podobnie jak w przypadku poprzedniej pracy, wypracowana przez Doktorantkę metodyka ma szansę zaowocować znacznym rozpowszechnieniem prowadzenia podobnych badań na innych niemodelowych gatunkach kręgowców. Takie podejście Doktorantki, w którym stara się w pionierski sposób poszerzać horyzonty badawcze zamiast odtwórczo replikować badania na kolejnych taksonach stanowi właśnie o wysokim nowatorstwie uzyskiwanych przez nią wyników, a także o ponadprzeciętnej jakości naukowej zaprezentowanych prac.

W końcu, trzecia praca (*PNAS*) jest przykładem eksperymentalnego badania przeprowadzonego na najwyższym naukowym poziomie, począwszy od planowania, poprzez jego realizację, aż po interpretację wyników. Na każdym z tych etapów daje się zauważyć wysoka rzetelność naukowa zespołu autorskiego, w tym Doktorantki. Świadczy o tym między innymi bardzo wysoka dbałość o wiarygodność uzyskiwanych wyników i wyprowadzanych z nich konkluzji. Na poziomie laboratoryjnym emanacją tej dbałości są częste niezależne replikacje wykonywanych procedur, pozwalające na wychwycenie i wykluczenie potencjalnych artefaktów i błędów metodologicznych (np. błędów sekwencjonowania). Na poziomie analiz dbałość ta odzwierciedlona została różnymi

podejściami metodologicznymi do testowania tych samych hipotez. Dla przykładu hipoteza optymalności testowana była na poziomie zarówno poszczególnych wariantów allelicznych, jak i supertypów MHC. W efekcie, uzyskane wyniki dają silne empiryczne poparcie dla testowanych hipotez, a żadna z zawartych w rozprawie konkluzji nie może zostać posądzona o bycie wynikiem nadinterpretacji.

Uwagi krytyczne

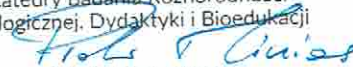
W pracach tworzących podstawę rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Migalskiej, ani w zaprezentowanych streszczeniach, nie dostrzegam w zasadzie błędów merytorycznych. Jedną z kwestii, na którą chciałbym zwrócić uwagę jest jednak interpretacja i wykorzystanie w tekście anglojęzycznego terminu *copy number variation*. Zwyczajowo termin ten, jak słusznie zauważa Doktorantka w szóstym akapicie streszczenia, odnosi się do zmiennej liczby kopi genów (loci), która w przypadku MHC obserwowana jest na poziomie międzygatunkowym lub wewnątrzgatunkowym. Dokładne określenie liczby genów MHC u większości niemodelowych gatunków, czy u poszczególnych osobników danego gatunku, jest jednak przy obecnym zaawansowaniu metod sekwencjonowania bardzo trudne bądź nawet niemożliwe. Stąd w badaniach ekologicznych liczbę genów MHC obecnych u danego gatunku czy osobnika szacuje się na podstawie obserwowanej liczby wariantów allelicznych. Należy jednak pamiętać, że międzyosobnicze różnice w liczbie wariantów allelicznych MHC mogą wynikać jedynie z różnego stopnia heterozygotyczności osobników i wcale nie muszą oznaczać, że poszczególne osobniki różnią się faktyczną liczbą genów. Jest to szczególnie prawdopodobne w przypadku gatunków, u których obserwujemy relatywnie niedawne duplikacje genów i gdzie, w konsekwencji, możemy obserwować te same allele MHC na różnych loci. Ponieważ w swoich badaniach Doktorantka korelowała wielkość repertuaru receptorów TCR z liczbą wariantów allelicznych, a nie genów MHC, wydaje się, że stawiane hipotezy i ich interpretacja powinny być utrzymane w tej samej konwencji terminologicznej. Mimo to, w kilku miejscach rozprawy pojawiają się sformułowania, że celem Doktorantki było testowanie związku między liczbą kopii (w rozumieniu liczby genów) MHC a zmiennością repertuaru TCR. Podobne nieścisłości pojawiają się przy interpretacji wyników badań innych autorów. Na przykład w streszczeniu pojawia się informacja, że nornica ruda została wybrana jako obiekt badań „... głównie ze względu na wysoką, międzyosobniczą zmienność w liczbie kopii genów MHC”, stwierdzenie to jednak odnosi się do źródeł prezentujących międzyosobniczą zmienność w liczbie wariantów allelicznych, a nie genów MHC, u tego gatunku.

Dodatkowo, brakuje mi w tekście poszczególnych prac dyskusji o potencjalnym wpływie pochodzenia osobników z hodowli laboratoryjnej na wyniki prowadzonych badań. Osobniki uwzględnione w badaniach pochodziły z trzech linii selekcyjnych poddawanych sztucznemu doborowi pod kątem różnych cech behawioralnych bądź fizjologicznych, oraz z grupy kontrolnej. O ile w drugiej pracy (*Scientific Reports*) znajduje się wzmianka, że pochodzenie osobników nie powinno mieć wpływu na wielkość repertuaru receptorów TCR, z czym się w pełni zgadzam, to większe wątpliwości mam w przypadku analizy siły doboru różnicującego działającego na geny MHC u nornic (*Heredity*). Wydaje mi się, że trudno jest z całą pewnością wykluczyć wpływ prowadzonych procedur doboru sztucznego na wzorzec podstawień nukleotydowych w obrębie MHC i, moim zdaniem, fakt ten powinien zostać przedyskutowany w tekście pracy. Z całą mocą chciałbym jednak podkreślić, że powyższe niedociągnięcia w zasadzie nie wpływają na merytorykę rozprawy i nie powinny w żaden sposób przesłonić jej bardzo wysokiej jakości naukowej.

Podsumowanie

Podsumowując, uważam, że rozprawa doktorska Pani mgr Magdaleny Migalskiej spełnia wymogi stawiane przez Ustawę z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz. U. Nr 65/03 poz. 595) i na tej podstawie wnoszę o **dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego**.

Biorąc pod uwagę niezwykle wysoki poziom merytoryczny przeprowadzonych badań, ich nowatorstwo oraz wysoką jakość powstałych publikacji naukowych, zwracam się do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu z wnioskiem o **wyróżnienie rozprawy stosowaną nagrodą**.

KIEROWNIK
Katedry Badania Różnorodności
Biologicznej, Dydaktyki i Bioedukacji

dr hab. Piotr Minias