

Recenzja rozprawa na stopień doktora nauk biologicznych pod tytułem:

**Liczba kopii genów MHC i wielkość repertuaru TCR
u nornicy rudej: zmienność, selekcja i hipoteza optymalności
autorstwa mgr Magdaleny Migalskiej**

Główny kompleks zgodności tkankowej (MHC) ma kluczowe znaczenie dla powstawania odporności nabytej czego warunkiem jest dyskryminacja własnych i obcych białek. Geny MHC są wyjątkowe pod względem skali zróżnicowania na poziomie populacji - żaden inny locus genetyczny u człowieka ani innych organizmów nie posiada tylu wariantów allelicznych co MHC (tysiące wariantów). Co więcej, polimorfizm MHC ma charakter funkcjonalny, tzn. wybiórczo dotyczy regionów bezpośrednio istotnych dla funkcji biologicznej białek MHC, tj. wiązania peptydów. W związku z funkcją MHC naturalnym tłumaczeniem znacznego polimorfizmu jest teoria proponująca, że osobnik z różnymi wariantami MHC ma mniejsze ryzyko napotkania patogenu, którego białka będą niewidoczne dla jego układu immunologicznego ponieważ nie będą źródłem peptydów wiązanych przez jego MHC.

Problemem takiego tłumaczenia jest natomiast obserwacja, że w porównaniu do olbrzymiej liczby wariantów MHC w populacji liczba wariantów obecna u danego osobnika jest jednak stosunkowo mała (kilka loci, dwa allele w locus). Tłumaczenie tego faktu od dawna było opierane na sugestii, że optymalna liczba cząsteczek MHC u pojedynczego osobnika jest ograniczana przez zjawisko negatywnej selekcji limfocytów zachodzące w grasicy. Zbyt wiele wariantów MHC mogłoby paradoksalnie powodować zubożenie akceptowalnego repertuaru limfocytów T ponieważ zbyt często mogłoby prowadzić do autoreaktywności (hipoteza optymalności). Powyższe zagadnienia są fundamentalne dla immunologii, pozostają jednak przedmiotem dyskusji oraz rozważań teoretyczny dosłownie od dziesiątków lat. Na marginesie, byłem osobiście świadkiem takich dyskusji z udziałem prof. Erika Thorsbyego jeszcze w latach 90 ubiegłego wieku w Instytucie Immunologii Transplantacyjnej w Oslo. Pomimo podstawowego znaczenia dla immunologii bezpośredni test ww. teorii polegający na analizie zależności między liczbą cząsteczek MHC a rozmiarem repertuaru limfocytów T w organizmie nie był dotychczas przeprowadzony.

W tej sytuacji bardzo wysoko należy ocenić cel przedstawionej pracy doktorskiej, którym było testowanie teorii optymalności poprzez sprawdzenie czy osobniki posiadające większą liczbę wariantów genów MHC charakteryzują się zmniejszonym repertuarem TCR. Chciałbym podkreślić, że nawet w skali europejskiej czy światowej rzadko spotyka się prace doktorskie, które ‘mierzą się’ z tak fundamentalnymi problemami.

Przedstawiona do recenzji Praca składa się z kopii trzech publikacji wymienionych poniżej.

Migalska, M., Sebastian, A., Konczal, M., Kotlík, P. & Radwan, J. *De novo* transcriptome assembly facilitates characterisation of fast-evolving gene families, MHC class I in the bank vole (*Myodes glareolus*). *Heredity* **118**, 348–357 (2017).

2. **Migalska, M.,** Sebastian, A. & Radwan, J. Profiling of the TCR β repertoire in non-model species using high-throughput sequencing. *Scientific Reports* **8**, 11613 (2018).

3. **Migalska, M.,** Sebastian, A. & Radwan, J. Major histocompatibility complex class I diversity limits the repertoire of T cell receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 201807864 (2019). doi:10.1073/PNAS.1807864116

Poza ww. publikacjami Praca zawiera szczegółowe oświadczenia Kandydatki oraz wszystkich współautorów dotyczącymi ich roli w powstaniu każdej z prac.

Dodatkowo Praca zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim, podziękowania oraz wskazanie źródeł finansowania.

Z oświadczeń wynika, że rola Kandydatki w każdej z prac była zdecydowanie wiodąca. W szczególności należy podkreślić, że Magdalen Migalska jest pierwszym autorem wszystkich prac oraz autorem korespondencyjnym dwóch z nich. Rola autora korespondującego nie jest typowa dla doktoranta - pełnienie tej funkcji przez Kandydatkę dodatkowo podkreśla jej samodzielność i kluczową rolę w opisywanych badaniach.

Wszystkie prace zostały opublikowane w prestiżowych pismach o zasięgu międzynarodowym posiadających wysoki impact factor: Heredity - 3.872, Scientific Reports – 4,122, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. - 9.504. Należy też podkreślić, że prace były publikowane w latach 2017, 2018, 2019 co dodatkowo potwierdza, że stanowią one łącznie spójną całość powiązaną nie tylko merytorycznie i logicznie ale także poprzez realizację w toku jednego znakomicie zaplanowanego i zrealizowanego projektu badawczego.

Artykuły stanowią zwartą i logiczną całość. W szczególności, dwie pierwsze prace uzupełniają wiedzę nt., odpowiednio, molekularnej zmienności genów MHC oraz TCR nornicy rudej (*Myodes glareolus*) – gatunku, który został wybrany jako model doświadczalny. Taki wybór modelu jest dobrze uzasadniony ponieważ nornica ruda wykazuje, jako gatunek, wysoką, międzyosobniczą zmienność w liczbie kopii genów MHC, co znacznie ułatwia testowanie hipotezy interesującej Autorkę.

W pierwszej publikacji Kandydatka zbadała molekularną ekspresję genów MHC klasy I u nornicy (7 osobników) uzupełniając wcześniejsze prace ograniczone do MHC klasy II tego gatunku. Wykorzystane techniki to składanie transkryptomu

de novo (po skwencjonowaniu NGS), klonowanie w wektorze bakteryjnym oraz sekwencjonowana metodą Sanger.

W drugiej publikacji stosując podejście i techniki podobne jw. Kandydatka zidentyfikowała u normicy 37 grup (prawdopodobnie odpowiadających loci) genów V oraz 11 grup genów J.

Należy podkreślić, że wyniki uzyskane w pierwszych 2 pracach są w pełni oryginalne i wartościowe stanowiąc istotny przyczynek do pełnej charakterystyki układu immunologicznego tego modelowego gatunku. Jednocześnie prace te stanowiły niezbędną podstawę dla pracy trzeciej, która jest centralną częścią rozprawy realizującą test hipotezy optymalności.

Rozpoczynając badania od ok 150 normic Autorka ostatecznie wybrała do pełnego sekwencjonowania repertuaru limfocytów TCR β 30 osobników. Kryteriami wyboru tej grupy była równa reprezentacja osobników o wysokiej i niskiej liczbie wariantów MHC, a także jakość RNA, równa reprezentacja płci oraz kierunków selekcji z kolonii. Ostatecznie, w wyniku sekwencjonowania uzyskano odpowiednią liczbę odczytów dla 28 osobników z ww grupy. Ostateczna wieloczynnikowa analiza statystyczna wykazała negatywną zależność pomiędzy liczbą wariantów aminokwasowych MHC klasy I a rozmiarem repertuaru TCR (wynik oczekiwany) oraz brak takiego wpływu liczby wariantów MHC klasy II (wynik nieoczekiwany).

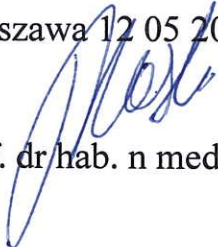
Należy jeszcze raz podkreślić, że hipoteza optymalności nie była wcześniej testowana w tak bezpośredni sposób. Uzyskany wynik jest intrygujący ze względu na rozbieżność pomiędzy efektem MHC kl I (efekt spodziewany) oraz kl II (brak efektu). W Dyskusji Autorka proponuje hipotezy mogące wyjaśnić tę różnicę. Wg mnie szczególnie ciekawa jest hipoteza zakładająca preferencyjny wpływ znacznej liczby genów MHC kl II na

ekspansję limfocytów supresorowych (a nie na selekcję negatywną). Należy pokreślić, że hipoteza ta jest w pełni testowalna i mam nadzieję, że jej badaniem Kandydatka już się zajmuje lub będzie mogła zająć się wkrótce.

Podsumowując, uważam, że przedstawiona praca autorstwa **Magdaleny Migalskiej** pt.: 'Liczba kopii genów MHC i wielkość repertuaru TCR u nornicy rudej: zmienność, selekcja i hipoteza optymalności' spełnia wymagania stawiane rozprawie na stopień doktora nauk biologicznych i w związku z tym wnioskuję o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na podstawowe znaczenie badanego problemu oraz, przede wszystkim, oryginalny w skali światowej charakter wyników wnioskuję o wyróżnienie Pracy.

Warszawa 12 05 2019


Prof. dr hab. n med. Rafał Płoski