

ISEZ PAN

**Instytut Systematyki i Ewolucji Zwierząt  
Polskiej Akademii Nauk**

---

ul. Sławkowska 17 • 31-016 Kraków

---

KRAKÓW, 27.01.2022

**dr hab. Łukasz Kajtoch, prof. ISEZ PAN**

Instytut Systematyki i Ewolucji Zwierząt PAN

Sławkowska 17

31-016 Kraków

**RECENZJA**

rozprawy doktorskiej magister EWY GABRIELI PIKUS

pt. „Rola głównego kompleksu zgodności tkankowej w procesach synurbizacji ptaków”,

doktorantki w Katedrze Badania Różnorodności Biologicznej, Dydaktyki i Bioedukacji

Instytutu Ekologii i Ochrony Środowiska, Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska

Uniwersytetu Łódzkiego

w związku z ubieganiem się o nadanie stopnia naukowego doktora

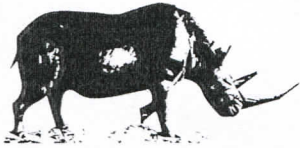
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne

Promotor: dr hab. PIOTRA MINIASA, prof. UŁ

Do wykonania oceny zostałem powołany decyzją Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne podjętą na posiedzeniu w dniu 14 grudnia 2021 r.

**WSTĘP**

Główny kompleks zgodności tkankowej (ang. *major histocompatibility complex*, MHC), to polimorficzna grupa genów odpowiedzialna za odpowiedź immunologiczną u kręgowców. Geny MHC były obiektem wielu badań u człowieka i niektórych organizmów modelowych, natomiast ich zmienność, funkcja i rola w odpowiedzi immunologicznej zostały zbadane jedynie dla niektórych gatunków dzikich. Stanowi to duży kontrast w stosunku do licznych badań polimorfizmu genetycznego markerów neutralnych. Poznanie MHC w populacjach gatunków niemodelowych znacząco zwiększa stan wiedzy o ich ewolucji i ekologicznych relacjach ze środowiskiem. Ciekawym aspektem tego rodzaju badań jest analiza polimorfizmu MHC w odpowiedzi na zmieniającą się presję patogenów jaką można obserwować np. w populacjach synantropijnych. W obliczu intensyfikacji zmian środowiskowych wywoływanych przez człowieka, na czele których stoi urbanizacja, studia nad MHC w populacjach gatunków dzikich mają szczególne znaczenie. Rozprawa doktorska Pani mgr Ewy Pikus wpisuje się w tą problematykę, traktując o roli zmienności i funkcji MHC w możliwościach adaptacji dzikiego gatunku ptaka (łyski) do warunków synurbicznych.



#### OCENA FORMALNA

Przedstawiona do recenzji rozprawa została wykonana w oparciu o trzy anglojęzyczne rozdziały: dwa stanowią manuskrypty przesłane do wybranych czasopism, a jeden to artykuł opublikowany.

**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*.

**Pikus, E., Dunn, P., Minias, P.** High MHC diversity does not confer fitness advantage in a wild bird.

**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, e12264.

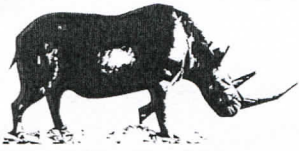
Artykuł trzeci opublikowany został w renomowanym czasopiśmie wielodziedzinowym klasyfikowanym w kwartylu 1 (Agricultural and Biological Sciences) lub kwartylu 2 (Biochemistry, Genetics and Molecular Biology), o współczynniku wpływu równym 2.98. Nie odnoszę się do rangi czasopism do jakich wysłane zostały dwa pierwsze rozdziały ponieważ manuskrypty te nie zostały przyjęte do druku w momencie złożenia rozprawy doktorskiej.

We wszystkich tych rozdziałach Doktoranta zajmowała miejsce autora pierwszego, natomiast jedynie w pierwszym z nich została podana jako autor korespondencyjny (wraz z promotorem, który wysłał artykuł, więc jest faktycznym autorem korespondencyjnym). **Przedstawione oświadczenia współautorów dowodzą, że wkład Doktorantki w powstanie wszystkich publikacji był dominujący** – odpowiadał on odpowiednio za 60%, 50% i 50% realizacji badań i przygotowania publikacji. Dostarczone materiały zostały przygotowane z należytą starannością i w mojej ocenie spełniają wymogi formalne.

#### OCENA OGÓLNA

Przedstawiona do recenzji rozprawa składa się z 151 stron, wliczając w to: polskojęzyczne i angielskie streszczenia, charakterystykę rozprawy w języku polskim, trzy rozdziały (manuskrypty i publikacja), podsumowanie dorobku, oraz oświadczenia współautorów publikacji.

Tytuł rozprawy doktorskiej wydaje się zbyt ogólny jak na tematykę badawczą ujętą w wymienionych trzech rozdziałach, ponieważ wszystkie badania dotyczyły wyłącznie jednego gatunku ptaka. Rozprawa jako taka stanowi ważny wkład w poznanie roli głównego kompleksu zgodności tkankowej w procesach synurbizacji łyski (*Fulica atra*). Niemniej problematyka badawcza



została sprecyzowana w opisie celów rozprawy, które odnoszą się już wyłącznie do łyski. Cykl trzech rozdziałów, wraz z polskojęzyczną częścią rozprawy, stanowi spójną i logiczną całość.

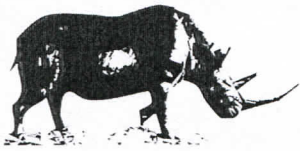
#### OCENA SZCZEGÓŁOWA

Opisowa, polskojęzyczna część rozprawy doktorskiej stanowi odwzorowanie treści zawartych w trzech rozdziałach, przy czym w dostarcza ona dodatkowych informacji, które w interesujący ale zwięzły sposób wprowadzają czytelnika w problematykę badawczą i cele rozprawy doktorskiej, opisują badany gatunek (łyskę), uzasadniają konstrukcję badań, szczegółowo omawiają podjęte prace terenowe, laboratoryjne i bioinformatyczne, oraz profesjonalnie podsumowują zebrane wyniki i wnioski. Pewnym problemem wynikającym z konstrukcji rozprawy, jest powielanie informacji, szczególnie tych prezentowanych we wstępach do każdego z rozdziałów i w ogólnym wstępie do rozprawy. Niemniej w doktoratach złożonych z cyklu prac takich powtórzeń trudno uniknąć i w mojej ocenie Doktorantka zachowała rozsądne proporcje i wybrała styl prezentacji części polskojęzycznej, który sprawia, że rozprawa jest przystępna w odbiorze.

Zasadnicze rozdziały rozprawy zostały ułożone w sposób logicznie prezentujący podjęte problemy badawcze. W kolejnych rozdziałach, mgr Ewa Pikus badała trzy zagadnienia dotyczące roli głównego kompleksu zgodności tkankowej w procesie synurbizacji łyski jako gatunku niemodelowego w badaniach ptaków zasiedlających miasta.

W rozdziale pierwszym mgr Pikus opisała polimorfizm regionów MHC klasy I i II oraz liczbę zduplikowanych genów tych kompleksów w wybranych populacjach miejskich i pozamiejskich łyski, wykorzystując do tego sekwencjonowanie całego genomu oraz celowane genotypowanie kluczowych eksonów. Wykorzystanie tych dwóch zaawansowanych metod molekularno-bioinformatycznych ujawniło, że region MHC łyski charakteryzuje się wyjątkowo złożoną strukturą w porównaniu do innych ptaków niewróblowych. W badaniach tych Doktorantka wykazała, że dobór różnicujący i sygnał rekombinacji jest słabszy w przypadku genów MHC klasy I niż klasy II, co może wskazywać na różne trajektorie ewolucyjne tych genów.

W rozdziale drugim Doktorantka powiązała polimorfizm genów MHC u łyski z komponentami dostosowania (związanymi z reprodukcją), cechami fenotypowymi związanymi z dostosowaniem (kondycją - stężeniem hemoglobiny we krwi, i ekspresją ornamentu - blaszki dziobowej), fenotypem (masą ciała) i heterozygotycznością. Mgr Pikus wykazała negatywny związek między różnorodnością genów MHC, a cechami związanymi z dostosowaniem, natomiast brak takiej zależności w odniesieniu do sukcesu reprodukcyjnego i heterozygotyczności. Wg Doktorantki wynik



taki można tłumaczyć mniejszą presją patogenów w populacjach miejskich, co wywołuje mniejsze koszty ekspresji wariantów allelicznych MHC.

W rozdziale trzecim mgr Pikus podjęła się sprawdzenia jak różni się polimorfizm genów MHC klasy II w zależności od stopnia urbanizacji badanych populacji łycki. Doktorantka wykazała, że różnorodność genów MHC jest większa w populacjach pozamiejskich niż miejskich (szczególnie populacji warszawskiej mającej najdłuższą historię synurbizacji łycki). Wyniki wskazywały, że kolonizacja miast przez łyckę związana była z utratą różnorodności MHC, być może na skutek efektu założyciela. Powyższe różnice w polimorfizmie genów MHC, przy jednoczesnym braku zróżnicowania neutralnych markerów mikrosatelitarnych między badanymi populacjami łycki, sugeruje że zmiany w puli genowej MHC mogą być efektem adaptacji odpornościowej ptaków do życia w siedliskach miejskich (zmiany w składzie fauny patogenów i pasożytów charakterystycznych dla obszarów zurbanizowanych).

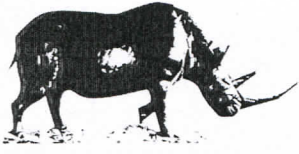
Zadaniem recenzenta jest wskazanie zarówno mocnych, jak i niejasnych stron rozprawy doktorskiej. Poniżej chciałbym zwrócić uwagę na kilka aspektów badań, które w mojej ocenie powinny być rozważone i wyjaśnione przez Doktorantkę w czasie publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

#### Rozdział 3.4.1. i Rozdział pierwszy

Chronologia stosowanych metod (sekwencjonowania amplikonów i genomowego) jest odmienna w opisie polskojęzycznym i rozdziale. Zastanawiałem się czy posiadając informacje genomowe obrazujące sekwencje genów MHC (czyli także fragmentu kodującego rowek wiążący peptyd PBR), możliwe było zaprojektowanie nowych par starterów pozwalających na powielenie większej liczby (lub wszystkich) loci MHC w części dotyczącej sekwencjonowania amplikonów (zamiast wykorzystania starterów zaczerpniętych z wcześniejszych badań, które umożliwiły powielenie połowy loci zidentyfikowanych u łycki)?

#### Rozdział drugi i trzeci

Ta część rozprawy jest szczególnie ciekawa ponieważ wiąże polimorfizm MHC z cechami osobniczymi badanego gatunku. Niemniej dyskusja otrzymanych prawidłowości jest miejscami spekulatywna z uwagi na brak informacji o różnicach w różnorodności i liczebności patogenów związanych z łyckami w populacjach miejskich i pozamiejskich. Dlatego też interpretowanie różnic w zmienności MHC w odniesieniu do adaptacji gatunku do mniejszej presji patogenów w populacjach miejskich powinno być pozostawione do dalszych badań. Autorzy manuskryptu są tego świadomi.



Ten sam problem pojawia się w rozdziale trzecim, gdzie różnice w polimorfizmie MHC są interpretowane w odniesieniu do presji patogenów, która nie jest znana.

Rozdział 3.4.2 i rozdział trzeci

Dlaczego wykorzystano jedynie 10 loci mikrosatelitarnych zaprojektowanych dla innych gatunków ptaków, zamiast panelu 18 loci opracowanych dla łyski w 2017 r. ([doi.org/10.1071/ZO16077](https://doi.org/10.1071/ZO16077))?

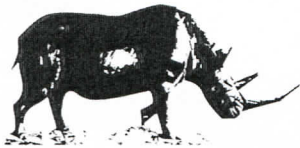
Analizując obraz STRUCTURE przygotowany na podstawie genotypów mikrosatelitarnych zastanowił mnie wzór przypisania osobników w populacjach do klastrów. Wygląda na to, że w każdej populacji połowa osobników została przypisana do jednego z klastrów, a połowa do drugiego. Nie spotkałem się z takim obrazem STRUCTURE i zastanowiło mnie jaka mogła być przyczyna takiego wzoru. Być może taki podział wynika z powiązania genotypowanych loci z jakimiś cechami osobniczymi. Podział na dwie w miarę równe grupy może sugerować sprzężenie z płcią, dlatego jestem ciekaw czy było to weryfikowane przez Doktorantkę? Drążąc problem sprawdziłem, że we wcześniejszej publikacji wykorzystującej mikrosatelity do genotypowania łysek (Minias et al., 2017), otrzymano podobny obraz. W tamtej pracy tłumaczono to poprzez obecność grup, spośród których jedna łatwo przemieszcza się między populacjami, a druga jest filopatryczna. Proszę aby Doktorantka odniosła się do możliwego wpływu takiej struktury populacji na interpretację polimorfizmu MHC w populacjach miejskich i pozamiejskich.

Dodatkowo interesuje mnie czy mając dane z ddRADseq (z Rozdziału drugiego, co prawda tylko dla jednej populacji miejskiej) sprawdzono czy pojawia się podobny wzór struktury populacji jak w przypadku mikrosatelit?

Cel 3 (str. 7) i Rozdział trzeci

Mam wątpliwości czy ten wątek badawczy faktycznie można określić jako analizę polimorfizmu MHC w gradiencie urbanizacji ponieważ badania dotyczyły zaledwie czterech populacji (2 miejskich i 2 pozamiejskich). Gradient zakłada ciągłą zmianę wartości danego parametru, czego w tym przypadku trudno się dopatrzeć.

Obraz jaki wyłania się z tego rozdziału wskazuje na to, że polimorfizm MHC jest najmniejszy w „starej” populacji miejskiej (warszawska), natomiast „nowa” populacja (łódzka) niewiele różni się pod tym względem od pozamiejskich. Tłumaczone jest to adaptacją łysek z długotrwałej populacji do zmniejszonej presji pasożytów, co zmniejsza potrzebę utrzymania wysokiej zmienności MHC. Tymczasem obie populacje pozamiejskie były zlokalizowane znacznie bliżej populacji łódzkiej niż warszawskiej, co może wskazywać na różnice geograficzne i relacje genetyczne między populacjami. Było to weryfikowane poprzez analizę polimorfizmu markerów neutralnych. Jednak moja powyższa



ISEZ PAN

## Instytut Systematyki i Ewolucji Zwierząt Polskiej Akademii Nauk

ul. Sławkowska 17 • 31-016 Kraków

uwaga oraz wcześniejsze badania (Minias et al., 2017) wskazują, że powiązania genetyczne populacji mogą mieć skomplikowane podłoże. Z jednej strony wyniki dowodzą odrębności populacji miejskich i pozamiejskich, ale z drugiej obraz STRUCTURE wskazuje na to, że przynajmniej część populacji łysek nie jest izolowana między miastem a obszarem pozamiejskim. Jeżeli tak jest to powraca pytanie o przyczynę różnic w zmienności MHC między odległą populacją warszawską a pozostałymi?

### OCENA DOROBKU

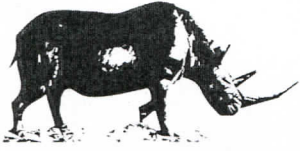
Mgr Ewa Pikus jest współautorką dalszych sześciu artykułów naukowych, w tym pięciu opublikowanych w czasopismach indeksowanych w Journal Citation Reports. Tematyka czterech spośród tych artykułów jest spójna z tematyką rozprawy doktorskiej – dotyczą badań nad MHC u ptaków. Publikacje te ukazały się w czasopismach o wysokich wskaźnikach bibliometrycznych (*Evolution, Genome Biology & Evolution, BMC Evolutionary Biology, Cells, Journal of Heredity*), doczekały się już 79 cytacji, co wraz z dorobkiem stanowiącym treść rozprawy doktorskiej, jest bardzo dobrym prognostykiem rozwoju naukowego Doktorantki.

### WNIOSEK KOŃCOWY

W mojej ocenie, cała rozprawa doktorska, a w szczególności opublikowany artykuł i przygotowane manuskrypty mają wysoką wartość naukową. Doktorantka podjął się znalezienia odpowiedzi na szereg pytań, które dostarczyły nowych, interesujących informacji dla nauki w tematyce polimorfizmu, funkcjonowania i roli genów głównego układu zgodności tkankowej u niemodelowego gatunku ptaka wodnego. W swoich badaniach wykazała się zarówno znajomością i umiejętnością pracy terenowej jak i laboratoryjnej oraz analitycznej. Na uwagę zasługuje biegłość Doktorantki w posługiwaniu się najnowszymi metodami molekularnymi i bioinformatycznymi. Jednocześnie mgr Pikus posiada szeroką wiedzę na temat biologii i ekologii badanego gatunku

Ja, niżej podpisany stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Ewy Pikus spełnia warunki określone w art. 13.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami) i wnioskuję Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

dr hab. Łukasz Kajtoch



ISEZ PAN

**Instytut Systematyki i Ewolucji Zwierząt  
Polskiej Akademii Nauk**

---

**ul. Sławkowska 17 • 31-016 Kraków**

---

Rozprawa doktorska mgr Ewy Pikus jest oryginalnym opracowaniem ważnego tematu badawczego, który został wykonany przez Doktorantkę z sukcesem o czym świadczy przygotowanie trzech manuskryptów, z których jeden został już opublikowany w renomowanym czasopiśmie. Doktorantka podjęła się realizacji tematów badawczych stanowiących duże wyzwanie tematyczne, logistyczne, jak i metodologiczne. Badania wykonane przez mgr Ewę Pikus w istotny sposób poszerzają wiedzę o zmienności genów MHC i ich roli w procesie synurbizacji ptaków, co może mieć praktyczne znaczenie w zrozumieniu mechanizmów determinujących występowanie organizmów w miastach stających się dominującym środowiskiem. Z powyższych powodów uważam, że rozprawa doktorska mgr Ewy Pikus zasługuje na wyróżnienie.

dr hab. Łukasz Kajtoch