



MUZEUM I INSTYTUT ZOOLOGII  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Dr hab. Małgorzata Pilot  
Muzeum i Instytut Zoologii PAN  
Stacja Ornitologiczna  
ul. Nadwiślańska 108  
80-680 Gdańsk  
Tel.: +48 58 308-07-59  
E-mail: mpilot@miiz.waw.pl

Gdańsk, 28 sierpnia 2023

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Tomasza Gaczorka pt. Adaptive introgression of MHC genes – a comparative analysis of vertebrate hybrid zones**

**Formalna charakterystyka rozprawy doktorskiej**

Rozprawa doktorska mgr Tomasza Gaczorka została przygotowana w Instytucie Nauk o Środowisku Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Wiesława Babika. Rozprawa składa się z trzech rozdziałów, z których dwa zostały opublikowane, natomiast trzeci został przedstawiony w formie maszynopisu. Wszystkie rozdziały są napisane w języku angielskim. Pierwszy rozdział dotyczy introgresji międzygatunkowej wariantów genów MHC u traszek z rodzaju *Triturus*. Drugi rozdział bada to samo zjawisko u jaszczurek z rodzaju *Podarcis*. Oba te rozdziały zostały opublikowane w czasopiśmie *Molecular Ecology*. Trzeci rozdział ma szerszy zasięg taksonomiczny, gdyż zajmuje się introgresją adaptacyjną wariantów genów MHC w oparciu o analizę stref hybrydowych dla 31 gatunków kręgowców. Rozdziały poprzedzone są streszczeniem, opisem struktury rozprawy oraz wstępem, zawierającym wprowadzenie do badanego zagadnienia, opis wspólnych elementów wszystkich trzech rozdziałów, wprowadzenie do metodyki stosowanej (we wszystkich rozdziałach) w celu stwierdzenia introgresji adaptacyjnej dla genów MHC, oraz streszczenia poszczególnych rozdziałów. Rozprawa zakończona jest generalną dyskusją, w której na podstawie wyników badań opisanych w trzech rozdziałach pracy Autor przedstawia odpowiedzi na pytania dotyczące introgresji międzygatunkowej wariantów genów MHC, opisuje szersze implikacje przedstawionych wyników oraz proponuje kierunki przyszłych badań.

Autor rozprawy deklaruje, że jego rola w powstaniu dwóch pierwszych, opublikowanych rozdziałów rozprawy doktorskiej polegała na opracowaniu koncepcji i metodyki badań, zaprojektowaniu starterów i analizie sekwencji alleli MHC, analizie danych w celu przetestowania introgresji adaptacyjnej wariantów genów MHC oraz przygotowaniu i redagowaniu maszynopisów. Trzeci rozdział jest maszynopisem samodzielnie przygotowanym przez Autora rozprawy, pod kierunkiem Promotora. Mgr Gaczorek odegrał zatem wiodącą rolę w powstaniu wszystkich trzech rozdziałów wchodzących w skład jego rozprawy doktorskiej.

**Struktura rozprawy**

Rozdziały rozprawy zostały zaprezentowane w kolejności odzwierciedlającej kolejne postępy w zrozumieniu badanych zagadnień. Zostały one poprzedzone generalnym wstępem i zakończone generalną dyskusją. O ile każdy z trzech rozdziałów rozprawy doktorskiej stanowi oryginalną pracę naukową wysokiej jakości, generalny wstęp i dyskusja zawierają niewiele oryginalnych elementów i w większości stanowią syntezę wstępów i dyskusji z poszczególnych rozdziałów. Taka synteza jest użyteczna i została dobrze wykonana, natomiast generalny wstęp i dyskusja mogły zostać poszerzone o nowe elementy. Jedynym nowym elementem było omówienie metodyki analizy introgresji adaptacyjnej wariantów genów MHC wraz z ryciną ilustrującą tę metodykę. We wstępie zabrakło natomiast innych elementów, np. jasnego zdefiniowania celów badawczych rozprawy (te cele zostały później zdefiniowane w poszczególnych rozdziałach) oraz analizy ograniczeń zastosowanej metodyki



## MUSEUM AND INSTITUTE OF ZOOLOGY POLISH ACADEMY OF SCIENCES

i porównania jej z innymi podejściami stosowanymi w podobnych badaniach. W przypadku trzech głównych rozdziałów pracy, napisanych w formie publikacji naukowych, wstęp i dyskusja musiały być związane ze względu na ograniczenia długości tekstu publikacji. W generalnym wstępie i dyskusji nie było takich ograniczeń, a zatem tematyka badań mogła zostać przedstawiona w szerszej perspektywie. Przykładowo, w generalnej dyskusji Autor wspomina inne przykłady introgresji adaptacyjnej wariantów genów znajdujących się pod wpływem doboru równoważącego; mogłyby zostać one szerzej omówione i porównane z badanym systemem. Należy jednak podkreślić, że rozprawa zawiera wszystkie niezbędne elementy i jej struktura jest prawidłowa.

### **Merytoryczna ocena rozprawy doktorskiej**

#### *Znaczenie podjętej tematyki badań*

Rozprawa doktorska mgr Tomasza Gaczorka dotyczy introgresji adaptacyjnej wariantów genów MHC u kręgowców, ze szczególnym uwzględnieniem płazów (Rozdział 1) i gadów (Rozdział 2). Badania przedstawione w trzech rozdziałach rozprawy umożliwiły udzielenie odpowiedzi na szereg ważnych pytań dotyczących introgresji międzygatunkowej w genach MHC u kręgowców, w tym oceny częstości występowania takiej introgresji w strefach hybrydowych, jej symetrii, roli doboru naturalnego w tej introgresji oraz różnic w tempie introgresji między klasami I i II genów MHC. Poprzez analizę porównawczą dużej liczby gatunków, badania te umożliwiły również poznanie generalnych wzorców zmienności w tych dwóch klasach genów u kręgowców. Trzy prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej przyniosły zatem istotny postęp w zrozumieniu mechanizmów ewolucyjnych kształtujących zmienność genów MHC, a w szczególności w jednoznacznym wykazaniu ważnej roli introgresji międzygatunkowej w kształtowaniu tej zmienności oraz znaczeniu tego procesu dla potencjału adaptacyjnego gatunków. Wyniki te mogą mieć praktyczne znaczenie dla ochrony zagrożonych gatunków kręgowców, które często charakteryzują się niskimi liczebnościami populacji i związaną z tym niską zmiennością genetyczną, w tym w genach MHC. Introgresja wariantów genetycznych w wyniku hybrydyzacji z blisko spokrewnionymi gatunkami może zatem skutkować zwiększeniem zmienności genów MHC u zagrożonych gatunków, co może przyczynić się do ich „odnowy genetycznej” (*genetic rescue*).

Badanie introgresji adaptacyjnej dla genów pod wpływem doboru równoważącego jest koncepcyjnie trudniejsze w porównaniu do genów pod wpływem doboru kierunkowego. Można przypuszczać, że wiele testów na obecność introgresji adaptacyjnej opracowanych z myślą o genach pod wpływem doboru kierunkowego nie wykrywa sygnałów doboru dla genów pod wpływem doboru równoważącego. Rozprawa doktorska mgr Gaczorka przedstawia metody badania introgresji adaptacyjnej dla genów pod wpływem doboru równoważącego i pokazuje ich skuteczność na przykładzie genów MHC. Metody te mogą być stosowane do badania introgresji adaptacyjnej dla innych genów pod wpływem doboru równoważącego, zarówno w analizach skupiających się na konkretnych grupach genów jak i w analizach całych genomów.

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Gaczorka znacząco przyczyniła się do rozwoju wiedzy na temat mechanizmów ewolucyjnych kształtujących zmienność genów MHC, a także na temat introgresji adaptacyjnej. Ponieważ wyniki przedstawionych badań sugerują, że geny MHC mogą być jednymi z ostatnich genów, które mogą podlegać wymianie między różnicującymi się gatunkami, praca ta ma również ważne znaczenie dla badań nad procesem specjacji.

#### *Cel badawczy rozprawy*



## MUSEUM AND INSTITUTE OF ZOOLOGY POLISH ACADEMY OF SCIENCES

Generalnym celem omawianej pracy doktorskiej była ocena częstości występowania introgresji adaptacyjnej wariantów genów MHC u kręgowców. Szczegółowe cele badawcze realizowane w poszczególnych rozdziałach były następujące:

- 1) porównanie zmienności genetycznej między poszczególnymi gatunkami w obrębie badanego rodzaju (Rozdział 1 i 2)
- 2) zbadanie, czy między gatunkami o przylegających do siebie zasięgach dochodzi do introgresji wariantów genów MHC (Rozdział 1)
- 3) ocena różnic w częstości introgresji między strefami hybrydowymi (Rozdział 1 i 2)
- 3) ocena różnic w częstości introgresji między dwiema klasami genów MHC (Rozdziały 1-3)
- 4) zbadanie, czy częstość introgresji dla genów MHC jest wyższa niż średnia dla całych genomów, co jest oczekiwane w przypadku introgresji adaptacyjnej (Rozdział 1 i 2)
- 5) sprawdzenie, czy stopień podobieństwa genetycznego dla genów MHC między gatunkami może zostać wytłumaczony przez czas dywergencji oraz wtórny kontakt (Rozdział 1)
- 6) sprawdzenie, czy możliwość wystąpienia introgresji genów MHC jest wystarczająca do jej wystąpienia poprzez porównanie proporcji wspólnych alleli między gatunkami o przylegających do siebie zasięgach oraz tymi o nieprzylegających zasięgach (Rozdział 2)
- 7) ocena symetrii introgresji wariantów genów MHC (Rozdział 2 i 3)
- 8) zbadanie częstości występowania introgresji adaptacyjnej wariantów genów MHC u 31 gatunków kręgowców (Rozdział 3)
- 9) zbadanie, czy czas dywergencji gatunków wpływa na tempo lub kierunek introgresji między nimi (Rozdział 3).

Szczegółowe cele badawcze nie zostały przedstawione w generalnym wstępie, zostały jednak opisane w poszczególnych rozdziałach (jako cele lub pytania/ zadania badawcze). Realizacja tych szczegółowych celów/ zadań badawczych umożliwiła osiągnięcie głównego celu pracy doktorskiej. W największym stopniu przyczyniła się do tego realizacja zadań badawczych z rozdziału trzeciego, jednak ten rozdział w dużym stopniu opierał się na koncepcjach i danych z dwóch pierwszych rozdziałów, a zatem wszystkie rozdziały przyczyniły się w komplementarny sposób do realizacji głównego celu.

### *Metodyka badań*

Wnioskowanie na temat obecności introgresji adaptacyjnej odbywało się w oparciu o porównanie wzorców introgresji między genami MHC a markerami rozmieszczonymi w obrębie całego genomu. Zmienność genów MHC była oceniana na podstawie fragmentów drugiego eksonu/egzonu łańcuchów MHC-I  $\alpha$  i MHC-II  $\beta$ , które biorą udział w prezentacji antygenów i które, według wcześniejszej pracy Promotora rozprawy, są dobrym wskaźnikiem ogólnego polimorfizmu MHC. Z zastosowanego podejścia wynika problem związany z niemożnością odróżnienia alleli pochodzących od różnych genów w obrębie każdej z klas. Przyczyną tego problemu jest sposób ewolucji genów MHC, nie można go zatem uznać za słabość tej pracy. Mimo, że istnieją sposoby rozwiązania tego problemu (np. sekwencjonowanie długich fragmentów DNA w celu empirycznej rekonstrukcji haplotypów), w tym przypadku byłoby to niepraktyczne. Zastosowane podejście zostało właściwie dobrane do badanego problemu.



## MUSEUM AND INSTITUTE OF ZOOLOGY POLISH ACADEMY OF SCIENCES

Markery reprezentujące zmienność w obrębie całego genomu zostały pozyskane w sposób oportunistyczny z wcześniejszych prac nad poszczególnymi badanymi taksonami. W związku z tym rodzaj markerów oraz ich liczba różnią się pomiędzy taksonami. W przypadku dwóch taksonów analizowano 13-15 mikrosatelitów, a w pozostałych przypadkach analizowano markery SNP, jednak zarówno ich liczba (od 49 do ponad 13 milionów) jak i sposób genotypowania znacznie się różnią między taksonami. Oszacowania stopnia introgresji w tych samych populacjach badanych przy użyciu mikrosatelitów i markerów SNP mogą się znacznie różnić (np. Cairns et al. 2023, *Molecular Ecology*), a precyzja oszacowania wykonanego dla kilkudziesięciu markerów w porównaniu z setkami tysięcy jest znacznie mniejsza. Sposób genotypowania tych markerów i ich położenie w obrębie genomu również mogą wpływać na oszacowanie stopnia introgresji. Najbardziej problematyczne są dane z Rozdziału 1, gdzie markery SNP zostały pozyskane z niepodlegających translacji regionów 3' genów. Nawet jeśli te regiony nie są pod bezpośrednim działaniem doboru, pozostają one pod jego wpływem ze względu na sprzężenie (*linkage*) z eksonami, nie reprezentują one zatem neutralnej zmienności genetycznej. Dodatkowo, ponieważ pochodzą one ze specyficznych regionów położonych w bezpośrednim sąsiedztwie eksonów, nie reprezentują one zmienności w obrębie całego genomu. Moim zdaniem stwierdzenie, że te SNPy powinny zapewnić wiarygodne oszacowanie introgresji w obrębie całego genomu („*they should provide a reliable estimate of genome-wide introgression*”) jest nadmiernie optymistyczne.

Ponieważ dane o zmienności w obrębie genomu są używane jedynie jako tło do analizy zmienności genów MHC, a wyniki uzyskane dla poszczególnych taksonów są zbieżne, to zróżnicowanie markerów reprezentujących zmienność w obrębie całego genomu może mieć niewielkie znaczenie w praktyce. Tym niemniej należałoby się spodziewać bardziej krytycznego (w sensie analizy ograniczeń) podejścia do stosowanych danych, a w generalnej dyskusji było miejsce na krytyczną analizę wybranej metodyki badań.

W celu stwierdzenia występowania introgresji adaptacyjnej w genach MHC zostały zastosowane cztery testy porównujące stopień introgresji w genach MHC ze stopniem introgresji w obrębie całego genomu. Te metody zostały przedstawione jako „w dużym stopniu niezależne” (*largely independent*). To stwierdzenie jest nieprecyzyjne, gdyż wszystkie metody oparte są na oszacowaniach introgresji i współdzielenia alleli między gatunkami na podstawie tych samych danych o zmienności genetycznej i przestrzennym rozmieszczeniu tej zmienności, nie mogą zatem być niezależne. Przykładowo, podział na populacje parapatryczne (zdefiniowane jako takie, w których występuje introgresja w obrębie całego genomu) i allopatryczne (takie, w których nie występuje introgresja) w teście B-I jest dyskretnym odzwierciedleniem ciągłych zmian w poziomie introgresji w obrębie całego genomu (*genomic cline*, test B-IV). Z kolei ten poziom introgresji musi być silnie skorelowany z położeniem osobników wzdłuż transektu (test B-III; Rycina 1 z generalnego wstępu). Zastosowane testy mają jednak potencjał do wyprodukowania kontrastujących ze sobą wyników i prawdopodobnie Autor miał to na myśli pisząc o ich niezależności. Metody te zostały dobrze dobrane do celu pracy i zgadzam się z przedstawionym w rozprawie stwierdzeniem, że zbieżność wyników tych testów u wielu różnych taksonów jest silnym dowodem na introgresję adaptacyjną w genach MHC.

W rozprawie badane są czynniki wpływające na asymetrię introgresji adaptacyjnej wariantów genów MHC (Rozdział 2 i 3). Ważnym czynnikiem, który nie został tu uwzględniony, jest efektywna wielkość populacji. Efektywna wielkość populacji wpływa zarówno na siłę doboru naturalnego, wpływającą na tempo introgresji adaptacyjnej, jak i na intensywność dryfu genetycznego, wpływającego na różnorodność genetyczną populacji. Efektywna wielkość populacji może być stosunkowo łatwo oszacowana w oparciu o neutralne markery genetyczne, które były dostępne dla badanych populacji, więc nie jest jasne, dlaczego ten parametr nie został uwzględniony w analizie przyczyn asymetrii.



## MUSEUM AND INSTITUTE OF ZOOLOGY POLISH ACADEMY OF SCIENCES

Możliwy wpływ efektywnej wielkości populacji jest wspomniany w tym kontekście (str. 80), więc być może zostanie on zbadany w przyszłych pracach na ten temat.

Mimo kilku dyskusyjnych punktów opisanych powyżej, metodyka pracy została odpowiednio dobrana. Zarówno analizy laboratoryjne jak i analizy danych zostały szczegółowo i precyzyjnie opisane i rzetelnie wykonane. Należy też podkreślić ogrom pracy włożony w pozyskanie danych genetycznych i w ich analizę, szczególnie w Rozdziale 3, w którym analizowano 31 gatunków kręgowców.

### *Wnioski z przeprowadzonych badań*

Najważniejszym wnioskiem z badań opisanych w rozprawie doktorskiej mgr Gaczorka jest powszechność występowania introgresji adaptacyjnej u kręgowców. Jest to zgodne z przewidywaniami na ten temat; ta praca po raz pierwszy dostarczyła silnego i jednoznacznego wsparcia dla tej hipotezy. Zaprezentowane wyniki badań wspierają również przewidywania teoretyczne na temat sposobu introgresji wariantów genów będących pod wpływem doboru równoważącego. Wniosek, że introgresja wariantów genów MHC jest kontynuowana do późnych etapów specjacji, jest ważny zarówno dla zrozumienia procesu ewolucji tych genów jak i dla zrozumienia procesu specjacji i może mieć również praktyczne znaczenie w definiowaniu gatunków i podgatunków. Kolejny wniosek z tej pracy, że introgresja może być ważnym źródłem nowych wariantów genów MHC i przyczyniać się do obserwowanego wysokiego polimorfizmu tych genów, ma potencjalne znaczenie praktyczne ze względu na możliwość wykorzystania introgresji w procesie „odnowy genetycznej” (*genetic rescue*) gatunków zagrożonych wyginięciem.

Proponowane przez Autora kierunki przyszłych badań dotyczą wykorzystania opracowanej w rozprawie metodyki badania introgresji adaptacyjnej genów MHC do analizy innych systemów genetycznych pod wpływem doboru równoważącego. Innym proponowanym kierunkiem badań jest ocena wpływu nowych alleli MHC pochodzących z introgresji na dostosowanie osobników. Zgadzam się z Autorem, że byłby to ważny krok dla zrozumienia związku pomiędzy siłą doboru naturalnego a tempem introgresji. Innym wskazanym przez Autora zagadnieniem wymagającym dalszych badań jest asymetria introgresji wariantów genów MHC między gatunkami, z tendencją do introgresji w kierunku gatunku o mniejszej różnorodności tych genów. Mimo przewidywań, że z czasem system ulegnie saturacji, co doprowadzi do zniknięcia asymetrii, nie zaobserwowano tego w praktyce. Wymaga to wyjaśnienia w dalszych badaniach. Autor sugeruje również potrzebę badań nad wykorzystaniem introgresji adaptacyjnej wariantów genów MHC jako źródła zmienności genetycznej dla populacji, które doświadczyły silnego efektu szyjki od butelki (*bottleneck*). Proponowane kierunki badań są obiecujące i ilustrują potencjał zaprezentowanej rozprawy doktorskiej w stymulowaniu dalszych badań nad ewolucją genów MHC i innych rodzin genów pod wpływem doboru równoważącego.

### **Podsumowanie**

Wyniki badań opisane w przedstawionej rozprawie doktorskiej stanowią istotny wkład w wiedzę na temat źródeł zmienności genów MHC u kręgowców, wskazując na ważną rolę introgresji adaptacyjnej w kształtowaniu tej zmienności. Poszerzając wiedzę na temat mechanizmów introgresji międzygatunkowej, badania te umożliwiają również lepsze zrozumienie procesu specjacji. Przeprowadzone analizy zostały dobrze zaplanowane i prawidłowo przeprowadzone. Wyniki zostały opisane w trzech artykułach naukowych, z których dwa zostały już opublikowane. Rozprawa została



**MUSEUM AND INSTITUTE OF ZOOLOGY  
POLISH ACADEMY OF SCIENCES**

przygotowana poprawnie i starannie. Moje uwagi do rozprawy dotyczą głównie szczegółów doboru metodyki, które mogłyby zostać szerzej omówione i przedyskutowane w generalnej dyskusji. Przedstawione uwagi nie umniejszają mojej wysokiej oceny tej rozprawy doktorskiej.

**Wniosek końcowy**

W mojej ocenie rozprawa doktorska mgr Tomasza Gaczorka spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2022 r. poz. 574 ze zm.). Wnioskuje do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Tomasza Gaczorka do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Przedstawione w rozprawie badania mają stanowić ważny wkład w rozwój ekologii molekularnej i immunologii ewolucyjnej oraz mogą znaleźć zastosowanie w genetyce konserwatorskiej. Dwa rozdziały rozprawy zostały już opublikowane w czasopiśmie *Molecular Ecology* o bardzo dobrej reputacji i wysokiej pozycji w rankingach czasopism z dziedziny biologii ewolucyjnej. Ze względu na wysoką wartość merytoryczną tej rozprawy wnioskuję o jej wyróżnienie.

*Małgorzata Pilot*

dr hab. Małgorzata Pilot