

Joanna Różańska-Wróbel

Związek genów układu odpornościowego nornicy rudej (*Clethrionomys glareolus*) z genami białek powierzchniowych krętków *Borrelia afzelii*

Streszczenie

Interakcje między żywicielami i pasożytami prowadzą do ich współzależnej ewolucji. Wynikająca z tych oddziaływań koewolucyjna dynamika wpływa na kształtowanie zmienności genetycznej, struktury populacji oraz rozprzestrzeniania się chorób. Może ona sprzyjać utrzymywaniu się wysokiego poziomu polimorfizmu, często przekraczającego założenia wynikające z neutralnej ewolucji. Teoria koewolucji zakłada specyficzne oddziaływania pomiędzy genami żywiciela i pasożyta, jednak niewiele jest bezpośrednich dowodów na takie interakcje, zwłaszcza wśród dzikich populacji kręgowców. Niniejsza rozprawa doktorska ma na celu wypełnienie tej luki poprzez badanie nornicy rudej (*Clethrionomys glareolus*) oraz infekującej ją bakterii *Borrelia afzelii*. Bakteria ta przenoszona jest przez kleszcze i u ludzi wywołuje chorobę zwaną boreliozą. Jednak człowiek jest przypadkowym żywicielem dla krętków *Borrelia*, a ich głównym nosicielem są małe ssaki i ptaki. Badania zawarte w rozprawie bazują na fakcie, że nornice rude są jednym z głównych, naturalnych żywicieli *B. afzelii* w Europie. W celu zgłębienia genetycznych podstaw interakcji żywiciel-patogen, praca skupia się na poszukiwaniu związków pomiędzy różnymi wariantami genów nornicy i krętków *Borrelia*, które kodują oddziałujące ze sobą białka, a także bada zmiany ekspresji genów nornic w odpowiedzi na infekcję bakterią *Borrelia*, wykorzystując sekwencjonowanie całych transkryptomów. Łącznie, oba te podejścia dążą do lepszego zrozumienia genetycznych oddziaływań gospodarz-pasożyt ukształtowanych przez koewolucję, a także zbadania szerszej perspektywy odpowiedzi immunologicznej nornic, która może leżeć u podstaw tolerancji na infekcję u tych gryzoni.

Pierwszy rozdział rozprawy skupił się na parze genów gospodarza i pasożyta, których produkty prawdopodobnie wchodzić ze sobą w bezpośrednią interakcję, napędzając wzajemną presję selekcyjną. Zbadane w nim zostały związki pomiędzy wariantami genów głównego kompleksu zgodności tkankowej (ang. *major*

histocompatibility complex, MHC) nornicy rudej, który bierze udział w swoistej odpowiedzi odpornościowej organizmu, a wariantami genu *ospC* (ang. *outer surface protein C*) krętków *B. afzelii*, który koduje immunogenne białko znajdujące się na powierzchni tych bakterii, służące *Borrelia* do manipulacji układem odpornościowym gospodarza. *OspC* występował w badanej populacji nornic w 12 wariantach. Wyniki testu Tajimy potwierdziły, że *OspC* ewoluuje pod wpływem doboru równoważącego. Analiza redundancji (ang. *redundancy analysis*, RDA) wykazała, że ani allele MHC klasy II, ani supertypy (grupy funkcjonalne) nie przewidywały statusu ani intensywności zakażenia, mierzonej metodą ilościowego PCR w czasie rzeczywistym (ang. *quantitative real-time PCR*, qPCR), szczepami *B. afzelii* charakteryzującymi się występowaniem różnych wariantów *OspC*. Niemniej jednak różnice w poziomach przeciwciał IgG przeciwko dwóm częstym w badanych populacjach wariantom *OspC*, wykazały statystycznie istotny związek z konkretnymi allelami MHC klasy II wśród seropozytywnych nornic. Wyniki te wskazują, że różne allele MHC mogą kształtować specyficzną dla wariantu odpowiedź immunologiczną na białko *OspC* krętków *Borrelia*, co jest zgodne z założeniami koewolucji gospodarz-pasożyt.

W drugim rozdziale rozprawy zbadano kolejną parę genów zaangażowanych w interakcję gospodarz-patogen: geny kodujące czynnik H (ang. *complement factor H*, CFH) nornicy rudej, który bierze udział w nieswoistej odpowiedzi immunologicznej i koduje białko regulatorowe alternatywnej ścieżki dopełniacza, oraz geny *ospE* (ang. *outer surface protein E*) kodujące białko powierzchniowe *B. afzelii*, które wiąże CFH gospodarza w celu uniknięcia wykrycia i zniszczenia przez jego układ odpornościowy. Wyniki testów PAML i MEME potwierdziły, że gen *ospE* ewoluuje pod wpływem działania doboru pozytywnego. Analiza redundancji nie wykazała jednak żadnych zależności pomiędzy wariantami genów CFH i należących do tej samej rodziny genów związanych z CFH (ang. *factor H-related*, FH-R), a wariantami *OspE*. Ponadto sieć haplotypów, skonstruowana w oparciu o sekwencje *OspE*, nie wykazała geograficznego zróżnicowania częstości wariantów *OspE*, które we wcześniejszych badaniach zaobserwowano dla CFH, a analiza ko-korespondencji (ang. *co-correspondence analysis*, CoCA) nie wykryła żadnej wspólnej struktury genetycznej między CFH i *OspE*. Wcześniejsze badania wykazały, że CFH charakteryzuje się silniejszą strukturą niż średnia genomowa u nornicy rudej, prawdopodobnie z powodu lokalnej adaptacji. Wyniki przedstawione w rozprawie

wskazują natomiast, że OspE nie odzwierciedla tej struktury, co sugeruje, że ewolucja tych dwóch genów może być kształtowana przez odrębne presje selekcyjne.

W rozdziale trzecim wykorzystano sekwencjonowanie RNA w celu zbadania zmian ekspresji genów nornicy rudej w odpowiedzi na zakażenie *B. afzelii*. Pozwoliło to zidentyfikować geny zaangażowane w obronę żywiciela przed infekcją, a także zgłębić w jaki sposób odpowiedź odpornościowa tego naturalnego gospodarza różni się od tej zgłaszanej dla przypadkowych żywicieli, takich jak człowiek. Analiza ekspresji genów, WGCNA (ang. *weighted gene co-expression network analysis*) oraz *functional enrichment* ujawniły aktywację genów związanych z nabytą odpowiedzią odpornościową, w szczególności związanych z funkcjonowaniem limfocytów B i produkcją przeciwciał. Odpowiedź prozapalna była natomiast obniżona w porównaniu z tą opisywaną u ludzi lub myszy laboratoryjnych. Ponadto zaobserwowano zmiany w ekspresji genów związanych z macierzą pozakomórkową, których białkowe produkty są wykorzystywane przez krętki *Borrelia* w celu ułatwienia adhezji i przetrwania w tkankach gospodarza. Zmiany te mogą odzwierciedlać ewolucyjną strategię tolerancji, która ogranicza uszkodzenia tkanek i zmniejsza ryzyko przewlekłych, ogólnoustrojowych objawów choroby u nornic. Co ciekawe, wykryto również kilka biologicznych ścieżek związanych z chorobami neurodegeneracyjnymi. Obejmowały one geny zaangażowane w metabolizm, produkcję energii, reakcję na stres oksydacyjny, a także degradację białek. Sugeruje to, że infekcja *B. afzelii* może mieć szersze konsekwencje dla swojego naturalnego żywiciela, niż dotąd przypuszczano.

Podsumowując, niniejsza rozprawa doktorska dostarcza informacji na temat genetycznych mechanizmów leżących u podstaw interakcji między żywicielem a patogenem w oparciu o naturalny system nornica ruda-*B. afzelii*. Praca ukazuje w jaki sposób koewolucja kształtuje zarówno specyficzne zależności na poziomie genów i różnych ich wariantów, takie jak związek między MHC a OspC, jak i szerszą perspektywę modulacji ekspresji genów w odpowiedzi na infekcję, podkreślając ewolucyjnie ukształtowaną tolerancję naturalnych żywicieli na zakażenie.

Słowa kluczowe: oddziaływania gospodarz-pasożyt, nornica ruda, *Borrelia afzelii*, borelioza