

Białowieża, 26.09.25 r.

Dr hab. Magdalena Niedziałkowska
Instytut Biologii Ssaków Polskiej Akademii Nauk
ul. Stoczek 1
17-230 Białowieża

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Joanny Różańskiej-Wróbel pt. „Związek genów układu odpornościowego nornicy rudej (*Clethrionomys glareolus*) z genami białek powierzchniowych krętków *Borrelia afzelii*”

Promotor:

Prof. dr hab. Jacek Radwan
Pracownia Biologii Ewolucyjnej
Wydział Biologii
Uniwersytet A. Mickiewicza w Poznaniu

Uwagi formalne

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Joanny Różańskiej-Wróbel składa się z następujących części: Stron tytułowych, Podziękowań, Spisu treści, Informacji o finansowaniu badań, Streszczenia w języku polskim, Abstraktu, Wstępu, Celów rozprawy, trzech rozdziałów zawierających jedną opublikowaną pracę i dwa maszynopisy publikacji, a także Podsumowania i kierunków przyszłych badań, Spisu literatury oraz Oświadczeń współautorów. Pierwszy rozdział rozprawy został opublikowany w bardzo dobrym czasopiśmie *Molecular Ecology* (IF= 3.9, Q1 w kategoriach Ecology i Evolutionary Biology). Badania zostały sfinansowane z grantu Narodowego Centrum Nauki. Kierownikiem tego projektu był prof. Jacek Radwan.

Na podstawie przedstawionych oświadczeń autorów publikacji i maszynopisów wchodzących w skład rozprawy doktorskiej mogę stwierdzić, że doktorantka miała istotny udział w zbiorze materiałów do badań, opracowaniu metodyki badawczej i prowadzeniu analiz molekularnych, a także opracowaniu uzyskanych wyników oraz ich wizualizacji i przygotowaniu maszynopisów publikacji. We wszystkich trzech pracach Pani mgr Joanna Różańska-Wróbel jest pierwszą autorką, a jej udział w przygotowaniu opublikowanej pracy wynosi 60%, a w przygotowaniu dwóch maszynopisów po 80% w każdym z nich.

Uwagi merytoryczne

Ogólnie ujmując celem badań zaprezentowanych w rozprawie doktorskiej pani mgr Joanny Różańskiej-Wróbel było lepsze poznanie genetycznych podstaw oddziaływania pomiędzy żywicielem a pasożytem w warunkach naturalnych. Obiektem badań były wolnożyjące drobne ssaki – nornice rude *Clethrionomys glareolus* oraz infekującą ją bakterie *Borrelia afzelii*, które są roznoszone przez kleszcze i u ludzi wywołują boreliozę. Głównymi nosicielami borelii są drobne ssaki i ptaki, w tym w Europie ich głównymi żywicielami są nornice rude – gryzonie zamieszkujące przede wszystkim siedliska leśne.

Relacje żywiciel–pasożyt stanowią jeden z ważniejszych i intensywnie rozwijających się obszarów badań z zakresu ekologii i biologii ewolucyjnej, a także mających praktyczne zastosowanie w medycynie, zdrowiu publicznym, rolnictwie czy ochronie przyrody. Pasożyty, jako jedne z najliczniejszych i najbardziej zróżnicowanych organizmów na Ziemi, wywierają presję selekcyjną na swoich żywicieli, prowadząc do powstawania złożonych strategii obronnych. Z kolei żywiele, rozwijając mechanizmy odpornościowe, wymuszają na pasożytach ciągłe dostosowania. Ten nieustanny proces sprzężenia zwrotnego określany jest jako koewolucyjny wyścig zbrojeń.

W nowoczesnych badaniach interakcji żywiciel-pasożyt wykorzystywane są duże zbiory danych genetycznych, które umożliwiają śledzenie ścieżek adaptacyjnych zarówno pasożytów, jak i żywicieli. Celem rozprawy doktorskiej Pani Różańskiej-Wróbel było sprawdzenie czy istnieją powiązania między genotypami gospodarza a genotypami patogenu i przetestowanie, czy poszczególne genotypy nornicy rudej wykazują większą podatność na infekcję określonymi genotypami *B. afzelii*. W pracy analizowano zależności pomiędzy różnymi wariantami genów nornicy i krętków *Borrelia*, które kodują oddziałujące ze sobą białka, a także badano zmiany ekspresji genów nornic w odpowiedzi na infekcję bakterią *Borrelia*, wykorzystując sekwencjonowanie całych transkryptomów. Ważnym aspektem przeprowadzonych badań jest fakt, że w analizach wykorzystano zwierzęta pochodzące z populacji żyjących w warunkach naturalnych. Tego rodzaju badania interakcji żywiciel-pasożyt są rzadkie i trudne do przeprowadzenia a interpretacja wyników skomplikowana, ze względu m.in. na złożoność procesów zachodzących w środowisku naturalnym. Jednocześnie wyniki takich badań są bardzo cenne, ponieważ lepiej odzwierciedlają rzeczywiste relacje zachodzące pomiędzy żywicielami a pasożytami, które mogą znacząco różnić się od interakcji wykazanych w warunkach laboratoryjnych.

Moje pytanie brzmi, czy Doktorantka zna jakieś przykłady badań z zakresu koewolucji żywiciel-pasożyt, których wyniki uzyskane w warunkach laboratoryjnych nie zostały potwierdzone w badaniach przeprowadzonych w warunkach naturalnych?

W pierwszym rozdziale rozprawy pt.: „*Interplay between vertebrate adaptive immunity and bacterial infectivity genes: Bank vole MHC versus Borrelia afzelii OspC*” zbadano relacje

między 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* kodującego immunogenne białko znajdujące się na powierzchni tych bakterii i służy do manipulacji układem odpornościowym gospodarza. Na podstawie przeprowadzonych analiz wykazano, że różnice w poziomach przeciwciał IgG przeciwko dwóm częstym w badanych populacjach wariantom *OspC*, wykazały statystycznie istotny związek z konkretnymi allelami genów MHC klasy II wśród seropozytywnych nornic. Wyniki te są zgodne z założeniami teorii koewolucji gospodarz-pasożyt. Nie wykazano natomiast związku między konkretnymi wariantami genów MHC, a poszczególnymi wariantami genów *OspC*.

W badaniach zaprezentowanych w tym rozdziale rozprawy wykorzystano osobniki nornicy rudej pochodzące z kilku wolnożyjących populacji z obszaru północno-wschodniej Polski (Pojezierza Mazurskiego) odławianych co 4 lata w drugiej połowie lata w latach 2002-2018. W rozprawie nie znalazłam żadnej informacji, czy uzasadnienia dlaczego do badań wykorzystano akurat te konkretne populacje i dlaczego odłowy prowadzono co cztery lata? Czy teren badań obejmuje jakieś ważne obszary pod względem np. zróżnicowania genetycznego nornic? Czy termin odłowów i ich cykliczność ma związek z dynamiką populacji badanych zwierząt? W Metodach jest informacja, że poszczególne miejsca odłowów były traktowane jako oddzielne populacje na podstawie struktury genetycznej: „*The sites show significant genetic structure (Migalska i in. 2022) and for the purpose of this study were treated as separate (sub)populations*”. Niestety nigdzie w pracy nie jest wyjaśnione o jaką strukturę genetyczną tutaj chodzi, czy o strukturę genetyczną nornic wyznaczoną na podstawie zmienności neutralnej czy np. genów MHC?

W Metodach w pierwszym rozdziale wspomniane jest też, że określano płeć i szacowano wiek badanych osobników, ale w prezentowanych Wynikach pracy nie znalazłam żadnej informacji, jak wyglądała struktura wieku i płci badanych nornic i czy były różnice w liczbie seropozytywnych i zainfekowanych nornic pomiędzy osobnikami różnej płci i wieku. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że ponad 70% osobników było seropozytywnych w kierunku przeciwciał anty-*OspC*, a tylko około 13% było zainfekowanych *Borelią*. Czy taki wynik może wynikać z dużego udziału osobników młodych w populacji, które otrzymały przeciwciała anty-*OspC* z mlekiem matki, a nie wytworzyły ich na skutek bezpośredniego kontaktu z bakteriami *Borelli*? Jeśli tak, to jak to mogło wpłynąć na uzyskane wyniki badań?

Na podstawie przeprowadzonych analiz wykazano, że 19% zmienności w poziomie przeciwciał wynika z intensywności zarażenia bakterią *Borelli* z konkretnym wariantem genu *OspC*, a zmienne towarzyszące (miejsce odłowu, płeć i wiek badanych osobników) wyjaśniają 18,6% tej zmienności. To oznacza, że ta zmienność wynika w podobnym stopniu z zarażenia bakterią z konkretnym wariantem genu, co z czynnikami związanymi z płcią, wiekiem i

miejscem pochodzenia badanych zwierząt. Czy Doktorantka może coś powiedzieć, jak te lub jeszcze inne czynniki (nieuwzględnione w tych badaniach) mogły wpłynąć na uzyskane wyniki?

W drugim rozdziale rozprawy pt. *"Do Borrelia afzelii outer surface protein E coevolve with complement factor H of its rodent host? Insights from GxG and spatial associations"* przeprowadzono analizy dotyczące kolejnej pary genów związanych z relacją gospodarz-pasożyt tzn. geny nornicy rudej kodujące czynnik H (ang. *complement factor H*, CFH) i geny OspE (ang. *outer surface protein E*) bakterii. Czynnik H bierze udział w nieswoistej odpowiedzi immunologicznej i koduje białko regulatorowe alternatywnej ścieżki dopełniacza. Natomiast geny OspE kodują białko powierzchniowe *B. afzelii*, które wiąże białko CFH gospodarza w celu uniknięcia wykrycia i zniszczenia przez jego układ odpornościowy. W badaniach tych wykorzystano dwa zestawy danych: 1) nornice z trzech populacji z Pojezierza Mazurskiego (te same próby, co analizowane w pierwszym rozdziale) i 2) próby nornic i kleszczy zebrane z 17 populacji w Polsce w latach 2020-2023. W wyniku przeprowadzonych badań nie stwierdzono 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. Mimo, że wykazano (na podstawie innych badań), że istnieje wyraźna przestrzenna struktura genetyczna w przypadku rozmieszczenia wariantów genów CFH, nie stwierdzono takiej struktury w przypadku wariantów genów OspE. Uzyskane wyniki dowodzą, że ewolucja tych dwóch genów przebiega niezależnie od siebie, pod wpływem innych czynników selekcyjnych.

W pracy wspomniano, że 17 populacji, z których pozyskano próby do badań było rozmieszczonych w różnych lokalizacjach w Polsce. Dodatkowo w pracy jest informacja, że istnieje wyraźna przestrzenna struktura genetyczna wyznaczona w oparciu o zróżnicowanie genów CFH. Myślę, że dla lepszego zrozumienia, w jaki sposób badania zostały zaplanowane, byłoby wskazane umieszczenie w pracy mapki z rozmieszczeniem punktów odłownych nornic oraz struktury genetycznej nornic na podstawie genów CFH.

Ciekawe, że w trzech populacjach mazurskich (próby z zestawu nr 1) zróżnicowanie genów OspE było wyjątkowo wysokie: 36 z 55 (65%), w tym 6 unikalnych wariantów znaleziono w tych lokalizacjach. Z czego to może wynikać? Czy może mieć na to wpływ różna liczba prób analizowanych w zestawie 1 i w zestawie 2 oraz inny okres czasu i długość prowadzenia odłowów na Mazurach (16 lat) i w pozostałych 17 lokalizacjach (4 lata)? Nie jest dla mnie jasne, czy w tych 17 lokalizacjach odłowy były prowadzone jednorazowo czy powtarzano odłowy w tych samych miejscach w kolejnych latach? Z informacji przedstawionych w pracy wynika, że w wśród tych 17 populacji, w których prowadzono odłowy w latach 2020-2023 była populacja nornic z Urwitału, gdzie prowadzono też odłowy w latach 2002-2018. Czy w tej lokalizacji stwierdzono te same warianty genu OspE w różnych okresach prowadzenia odłowów? Zastanawiam się, jaki wpływ na uzyskane wyniki zmienności genu OspE może mieć fakt, że analizowano materiał różnej wielkości i zebrany w różnych przedziałach czasowych? Może warto tu byłoby podać ile wariantów genów OSP przypadało na ile przeanalizowanych prób w

każdej z populacji na rok, żeby łatwiej można było porównać zróżnicowanie tych genów OSP między różnymi obszarami badawczymi?

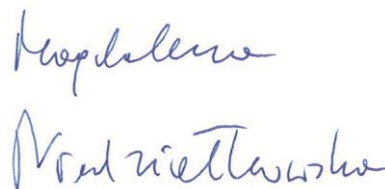
W rozdziale trzecim pt. *"Transcriptomic response to Borrelia afzelii infection in the skin of wild bank voles"* zbadano sekwencje RNA w celu sprawdzenia jak zmienia się ekspresja genów nornicy rudej w odpowiedzi na zakażenie *B. afzelii*. Do badań wykorzystano tkanki skóry, w których dochodzi do pierwszego kontaktu bakterii z gospodarzem. Materiał do badań pobrano od 44 dziko żyjących nornic, z których część była niezainfekowana, a część zainfekowana *B. afzelii*. Przeprowadzone analizy wykazały aktywację genów związanych z nabytą odpowiedzią odpornościową związanych z funkcjonowaniem limfocytów B i wytwarzaniem przeciwciał. W sumie zidentyfikowano 73 genów o zróżnicowanej ekspresji oraz sześć modułów genowych skorelowanych z infekcją. Analiza ujawniła szereg genów związanych z odpowiedzią immunologiczną, jak również liczne geny zaangażowane w procesy metaboliczne, organizację struktury komórkowej, regulację ekspresji genów oraz cyklu komórkowego. Stwierdzono, że odpowiedź prozapalna u nornic była obniżona w porównaniu z tą opisywaną u ludzi lub myszy laboratoryjnych. Poza tym zaobserwowano zmiany w ekspresji genów związanych z macierzą pozakomórkową, których białkowe produkty są wykorzystywane przez krętki *Borrelia* w celu ułatwienia przyłączania się i przetrwania w tkankach gospodarza. Interesującym wątkiem uzyskanych wyników jest też odkrycie szlaków biologicznych powiązanych z chorobami neurodegeneracyjnymi (takimi jak choroba Parkinsona, Huntingtona i Alzheimer). Ekspresja genów związanych z tymi szlakami była wyższa u nornic zainfekowanych *Borelią*. Myślę, że te zagadnienia są bardzo ważne i warte podjęcia dalszych badań. Zastanawiam się, czy można założyć, że skoro takie związki zakażenia boreliozą z ekspresją genów powiązanych z chorobami neurodegeneracyjnymi stwierdzono u nornic, u których odpowiedź prozapalna jest generalnie niższa niż u ludzi, to takie zależności też powinny występować u ludzi? Czy zakażenie boreliozą może mieć związek z wystąpieniem chorób neurodegeneracyjnych u ludzi? Czy prowadzono już jakieś badania na ten temat?

Uwagi końcowe

Wyniki analiz przedstawione w rozprawie doktorskiej Pani mgr Joanny Różańskiej-Wróbel dostarczają nowych, cennych danych, które pozwalają lepiej zrozumieć zależności genetyczne między głównym żywicielem – nornicą rudą a jej pasożytem – bakterią *B. afzelii* w warunkach naturalnych. Uzyskane wyniki inspirują, a także stanowią podstawę do podjęcia dalszych badań, które mogą mieć ważne, aplikacyjne znaczenie np. w zakresie zdrowia publicznego i medycyny. Doktorantka uczestniczyła we wszystkich etapach realizowanego projektu tzn. w planowaniu badań i zebraniu materiału, w pracach laboratoryjnych, opracowaniu uzyskanych danych (w tym przeprowadzeniu zaawansowanych analiz statystycznych), wnikliwej interpretacji i krytycznej ocenie wyników oraz przygotowaniu maszynopisów publikacji. Na podstawie uzyskanych rezultatów można wywnioskować, że Doktorantka opanowała wszystkie istotne umiejętności, niezbędne do prowadzenia wysokiej

jakości badań naukowych. Przedstawione przeze mnie uwagi do rozprawy, nie wpływają na ogólną, pozytywną ocenę merytoryczną dysertacji.

Podsumowując, przedłożona przez Panią mgr Joannę Różańską-Wróbel rozprawa doktorska pt.: „*Związek genów układu odpornościowego nornicy rudej (Clethrionomys glareolus) z genami białek powierzchniowych krętków Borrelia afzelii*” w pełni spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim określone w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2024 poz. 1571 z późn. zm.). Wnioskuje do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza o dopuszczenie Pani mgr Joanny Różańskiej-Wróbel do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej, ze względu na złożoność przeprowadzonych badań, analizę bardzo dużego materiału badawczego z wykorzystaniem zaawansowanych metod badawczych oraz wnikliwą i krytyczną interpretację uzyskanych wyników.



Dr hab. Magdalena Niedziałkowska