



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii
Instytut Biologii Ewolucyjnej



Warszawa, 15 sierpnia 2022 r.

Dr hab. Anna Karnkowska
Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, Instytut Biologii Ewolucyjnej
Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych, ul. Żwirki i Wigury 101, pokój 4.146
e-mail: a.karnkowska@uw.edu.pl
tel.: +48 22 66 266 41

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Krocak, pt. „Struktura i ewolucja genomów mitochondrialnych na przykładzie wybranych rzędów ptaków”

Przedmiot rozprawy i jego naukowe znaczenie

Przedmiotem rozprawy Pani mgr Aleksandry Krocak jest ewolucja struktury i składu genów w genomach mitochondrialnych ptaków. Choć genomy mitochondrialne kręgowców są niewielkie i zwykle niosą te same geny, to jednak w genomach mitochondrialnych ptaków spotykane są duplikacje, których historia ewolucyjna jest słabo poznana. Autorka skupiła się na wybranych rzędach ptaków, które reprezentują jednak większość różnorodności w tej grupie zwierząt, analizując strukturę ich genomów mitochondrialnych (mitogenomów). Dotychczas sądzono, że duplikacje w mitogenomach ptaków są sporadyczne i nie przypisywano im istotnej roli w ewolucji tej grupy zwierząt. Dopiero zastosowana przez Autorkę nowa strategia identyfikacji zduplikowanych fragmentów w genomie mitochondrialnym ptaków oraz bardzo dokładna analiza zdeponowanych już sekwencji, pozwoliła wykryć obecności powtórzonych fragmentów u przeważającej części badanych taksonów. Wynik ten podważa dotychczasowy stan wiedzy, jak również umożliwia Autorce sformułowanie szeregu ciekawych pytań badawczych. Mgr Krocak postawiła sobie za zadanie opisanie zróżnicowania zduplikowanych regionów, ze szczególnym uwzględnieniem papug, dla których otrzymała największy zbiór danych. Podjęła się również odpowiedzi na pytanie czy duplikacje pojawiały się wielokrotnie i niezależnie, czy raczej są to stany ancestralne, a brak regionów zduplikowanych wynika z ich losowej redukcji. Autorka badała również zjawisko heteroplazmii mitogenomów u ptaków i jego związek z duplikacjami. Uzyskane przez Autorkę wyniki i przeprowadzone analizy umożliwiły wykazanie powszechnego występowania duplikacji w mitogenomach ptaków, jak również prawdopodobnie u wspólnego przodka współczesnych ptaków. Jednocześnie w ewolucji mitogenomów u ptaków dochodziło do redukcji, utrat i ujednolicenia zduplikowanych regionów, co może prowadzić do błędów w interpretacji relacji pokrewieństwa



Instytut Biologii Ewolucyjnej
Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych UW
ul. Żwirki i Wigury 101, 02-089 Warszawa
tel.: 22 55 266 41
e-mail: a.karnkowska@uw.edu.pl
<http://www.ibe.biol.uw.edu.pl>

badanych gatunków w analizach filogenetycznych opartych na markerach znajdujących się w obrębie zduplikowanych regionów. Autorka wykazała również po raz pierwszy zjawisko heteroplazmii, czyli występowania różnych wariantów mitogenomów u ptaków. Uzyskane wyniki mają duże znaczenie poznawcze i poszerzają naszą wiedzę o ewolucji ptaków, a także genomów mitochondrialnych. Okazuje się, że nawet blisko spokrewnione organizmy mogą różnić się strukturą mitogenomów, co prawdopodobnie nie pozostaje bez wpływu na ich ewolucję. Przedstawione wnioski skłaniają również do stawiania kolejnych pytań, przede wszystkim dotyczących związku duplikacji z dostosowaniem i fizjologią konkretnych taksonów ptaków.

Formalny opis rozprawy

Przedstawiona do oceny rozprawa została wykonana na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego w Zakładzie Bioinformatyki i Genomiki pod opieką prof. dr hab. Pawła Mackiewicza. Rolę promotora pomocniczego pełnił dr Adam Urantówka. Praca przygotowana jest w formie monografii i zawiera typowe dla tego typu opracowań rozdziały. Całość pracy liczy ponad 220 stron, w tym liczne załączniki, zawierające numery dostępowe sekwencji, sekwencje starterów i inne szczegółowe informacje, które były zbędne w głównym tekście rozprawy. Autorka zilustrowała pracę licznymi rycinami, oraz tabelami, które są czytelne i znacząco pomagają śledzić wywód. W pracy są liczne odwołania do literatury, zarówno dotyczącej ewolucji mitogenomów u ptaków, jak i bardziej ogólne dotyczące mechanizmów ewolucji genomów, ewolucji genomu mitochondrialnego, czy też metod wykorzystywanych w badaniach struktury i ewolucji genomów mitochondrialnych.

Prezentowana praca przygotowana jest w formie monografii, a jednocześnie Autorka ma na swoim koncie imponujący dorobek publikacyjny. Zabrakło mi jednoznacznej informacji, czy prezentowane wyniki są już opublikowane w wymienionych pracach, czy też stanowią nowy i niepublikowany materiał.

Ocena merytoryczna

Obszerny wstęp obejmuje zagadnienia ogólne dotyczące pochodzenia mitochondriów (i ich genomów) oraz ich ewolucji. W szczególności Autorka skupia się na różnorodności mitogenomów kręgowców, co stanowi dobre wprowadzenie do szczegółowego opisu aktualnego stanu wiedzy na temat mitogenomów ptaków. Jednocześnie w sposób wyczerpujący przedstawia takie zjawiska jak przenoszenie genów z genomu mitochondrialnego do jądrowego, rearanżacje w genomach mitochondrialnych oraz kwestię heteroplazmii. Największy nacisk Autorka położyła oczywiście na zjawiska występujące w genomach mitochondrialnych ptaków, ale odniosła się również do ogólnego stanu wiedzy na temat mechanizmów ewolucyjnych tych procesów. W tym kontekście zabrakło mi jednak szerszego przedstawienia hipotez odnośnie ewolucyjnego znaczenia opisywanych zjawisk, w szczególności duplikacji i rearanżacji w genomach mitochondrialnych. Wątek ten pojawia się dopiero w dyskusji i również nie jest potraktowany w mojej ocenie wyczerpująco.

We wstępie Autorka podkreśla, że dotychczas stosowane strategie sekwencjonowania nie pozwalają na wykrycie duplikacji w mitogenomach ptaków, nie jest jednak jasne dlaczego strategie te były błędne i czy chodzi o dobór starterów, czy o metodę, którą sekwencjonowano poszczególne genomy. Wyjaśnia się to dopiero w rozdziale Metody. Zarówno w rozdziale Wstęp, jak i Metody, nie pojawia się jednak uzasadnienie doboru badanych taksonów, oraz wyboru papug do szczegółowych badań. Autorka przebadła większość



rzędów ptaków, ale w pracy przewija się sformułowanie „wybrane”, zastanawia więc kryterium doboru. W związku z tym, chciałabym aby Autorka odpowiedziała na pytanie:

Jakie było kryterium doboru analizowanych rzędów i gatunków ptaków i jaki jest kontekst filogenetyczny przeprowadzonych badań?

Metody opisane są bardzo dokładnie, w tym oczywiście zaproponowana nowa strategia amplifikacji fragmentów genomów mitochondrialnych, która umożliwia wyrycie duplikacji. Większość metod jest typowa dla tego typu badań i prawidłowo dobrana. Metody obejmują zarówno prace laboratoryjne, jak również analizę danych. Autorka zdecydowała się na metodę sekwencjonowania tzw. Primer Walking, co uzasadnia jej dokładnością. Zaproponowana metodyka umożliwia otrzymanie bardzo wiarygodnych wyników, choć jest pracochłonna. Jednocześnie Autorka postuluje, że inne metody sekwencjonowania mogą prowadzić do otrzymania błędnych wyników. Choć po części się z tym zgadzam, to jednak można znacząco takie błędy ograniczyć dobierając metodykę składania krótkich odczytów i późniejszej analizy danych lub stosując sekwencjonowanie trzeciej generacji (długich odczytów).

Czy Autorka widzi możliwość zastosowania sekwencjonowania wysokoprzepustowego w przedstawionych badaniach, jakie są dokładnie ograniczenia tego podejścia i jakiego rodzaju błędy mogą powstawać w wyniku składania danych z sekwencjonowania wysokoprzepustowego?

Przedstawione wyniki są bardzo obszerne. Autorka przebadła 338 taksonów ptaków, co znacząco powiększyło dotychczasowy zbiór poznanych sekwencji mitogenomów w tej grupie organizmów. Jednocześnie przeanalizowała zdeponowane w bazach danych sekwencje i wykazała, że często były błędnie scharakteryzowane jako mitogenomy bez duplikacji. Tak obszerny zbiór danych umożliwił przekrojowe analizy, oraz doprowadził do wykrycia bardzo dużej liczby rejonów powtórzonych. Autorka wykazała obecność takich rejonów u 261 taksonów (w tym 89, które wcześniej opisane były jako taksony bez duplikacji). Dla 13 rzędów ptaków po raz pierwszy stwierdziła duplikację w mitogenomie ich przedstawicieli. W konsekwencji wykazała, że dotychczasowe poglądy w kwestii częstości duplikacji w mitogenomach ptaków są błędne. Nie tylko duplikacje te występują stosunkowo często, ale również, jak wynika z analizy stanów ancestralnych, prawdopodobnie w większości przypadków są oddziedziczone po wspólnym przodku. Wyniki te są interesujące i przekonujące, choć nasuwają kilka pytań.

Czy rzędy ptaków, w których do tej pory nie wykryto duplikacji charakteryzują się czymś szczególnym? Czy stanowią odrębny kład, albo mają jakąś cechę wspólną? Jak wiele taksonów z tych rzędów przeanalizowano?

Autorka przyjęła w trakcie analiz pewne założenia, a mianowicie, że co najmniej 30% (lub 50%) taksonów w danym rzędzie musi posiadać duplikację, żeby wnioskować o tym, że wspólny przodek tego rzędu posiadał duplikację. Nie jestem do końca przekonana co do tej strategii, w niektórych rzędach badano wiele gatunków, w innych pojedyncze. Jednocześnie Autorka założyła, że nabycie duplikacji i utrata duplikacji są zdarzeniami o równym prawdopodobieństwie. Jest to oczywiście jedna z możliwości, ale z tego co Autorka pisze, wnioskowałabym raczej, że to utraty są częstsze.

Jakie są ograniczenia i zalety przyjętych założeń? Czy przyjęcie różnego prawdopodobieństwa nabycia i utraty duplikacji wpłynie na rekonstrukcję stanów ancestralnych? W jaki sposób uwzględniano obecność śladów duplikacji wykrywanych w NUMTach?



Analiza paralogów i ortologów wśród powtórzonych rejonów kontrolnych wskazuje zarówno na przypadki duplikacji, które miały miejsce u wspólnych przodków różnych kładów, jak i na niedawne duplikacje w obrębie jednego taksonu. Jednocześnie Autorka wykryła zjawisko ujednoczenia sekwencji zduplikowanych regionów kontrolnych utrzymywanych w genomie. Wynik ten uważam za istotny, również ze względu na jego praktyczne zastosowanie. Złożona ewolucja regionów kontrolnych (duplikacje, zanikanie, oraz homogenizacja) powoduje, że fragmenty te nie stanowią wiarygodnego markera w analizach filogenetycznych.

Wśród analizowanych porządków genów w zduplikowanych fragmentach Autorka wykryła aż 36 porządków genów charakterystycznych tylko dla jednego rzędu, co sugeruje, że zanikanie zduplikowanych elementów może być losowe. Autorka zaobserwowała pewną preferencję w występowaniu pierwszych lub drugich kopii zduplikowanych elementów, która może wynikać z tendencji poszczególnych elementów do duplikacji lub presji selekcyjnej zachowującej daną kopię, ale na tym etapie trudno wysnuć bardziej konkretne wnioski. Często badane taksony nie były blisko spokrewnione, co ogranicza interpretację tego typu wyników. Autorka przeanalizowała bardzo dużą liczbę danych pochodzących od papug. Ta analiza wykazała bardzo dużą dynamikę procesów duplikacji i ich utrat, co więcej wskazując na wysoką częstość duplikacji.

Czy zdaniem Autorki papugi są tu wyjątkiem, czy jest to jedynie wynik zgromadzenia większej liczby danych i możemy sądzić, że dla innych grup ptaków zaobserwujemy podobną sytuację w wyniku analizy większej liczby danych?

Autorka wykazała również występowanie u ptaków genomów mitochondrialnych różniących się liczbą genów, czyli tzw. heteroplazmię. Udało się to dzięki odpowiednio opracowanej strategii umożliwiającej identyfikowanie obecności różnych wariantów mitogenomów. Autorka wykryła heteroplazmię u 45 taksonów reprezentujących 12 rzędów ptaków, co sugeruje że jest to zjawisko powszechne. W tym miejscu należy podkreślić, że Autorka po raz pierwszy stwierdziła obecność różnych wariantów mitogenomów u ptaków. Zjawisko to oczywiście może mieć konsekwencje ewolucyjne i jego wykrycie uważam za bardzo istotny wynik.

Otrzymane wyniki są bardzo dogłębnie przedyskutowane w rozdziale Dyskusja. Autorka krytycznie podeszła do wyników własnych, jak również skonfrontowała je z dostępną literaturą na temat ewolucji mitogenomów. Wnioski ewolucyjne są w pewien sposób ograniczone ze względu na nie do końca poznane mechanizmy prowadzące do duplikacji, a także ich utrat. Autorka przytacza aktualne poglądy w tej kwestii, które jednak nie pozwalają na wyjaśnienie niektórych obserwowanych zjawisk. Przede wszystkim, proponuje się, że w genomach mitochondrialnych kręgowców dochodzi do eliminacji zduplikowanych elementów genomowych, co stoi w sprzeczności z powszechnym występowaniem u ptaków mitogenomów z duplikacjami. Wynik ten na pewno stanowi istotną przesłankę do dalszych badań nad mechanizmami powstawania i utrat duplikacji, jak również ich ewolucyjnego znaczenia. W dyskusji zabrakło mi szerszego omówienia kwestii wpływu duplikacji na ewolucję i fizjologię, jak również propozycji dalszych badań i pytań, które można postawić na podstawie dotychczasowych wyników. Szczególnie interesuje mnie kwestia skutków takich duplikacji, zarówno u ptaków, jak i u innych organizmów.



Jaki może być wpływ zduplikowanych rejonów na fizjologię organizmów, u których doszło do duplikacji. Czy wszystkie geny w zduplikowanych rejonach ulegają ekspresji? Jakie badania zaproponowałaby Autorka aby odpowiedzieć na te pytania?

Podsumowując, uzyskane wyniki i wyciągnięte z nich wnioski, oraz dogłębna dyskusja rzucają nowe światło na ewolucję genomów mitochondrialnych ptaków. Za kluczowe uważam wykazanie, że:

- 1) Wspólny przodek wszystkich współczesnych ptaków najprawdopodobniej posiadał duplikację w swoim genomie mitochondrialnym, która została oddziedziczona przez wiele głównych linii, a utracona tylko w kilku.
- 2) U papug, dochodziło częściej do duplikacji niż ich utrat, co sugeruje dynamiczną ewolucję mitogenomów w tej grupie ptaków.
- 3) W genomach mitochondrialnych ptaków występuje zjawisko heteroplazmii.
- 4) W rejonach zduplikowanych mitogenomów ptaków może dochodzić do ujednociania kopii genów.

Ocena edytorskiej strony rozprawy

Pod względem edytorskim i językowym praca przygotowana jest poprawnie. W tekście zdarzają się drobne błędy językowe i literowe, co nie wpływa istotnie na odbiór całości. Przedstawione ryciny są czytelne, choć przed publikacją warto by było dopracować je graficznie (np. wykorzystywanie koloru czerwonego i zielonego na jednej grafice jest niewskazane).

Wniosek końcowy

Podsumowując, rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry KroczaK spełnia kryteria stawiane pracom doktorskim i świadczy o jej dojrzałości naukowej. Uzyskane wyniki badań znacznie poszerzają naszą wiedzę na temat ewolucji genomów mitochondrialnych u ptaków. Praca została poprawnie przygotowana i zredagowana. Pani mgr KroczaK, wykazała, że posiada odpowiedni warsztat oraz samodzielność naukową niezbędną do stawiania pytań, prowadzenia badań i ich opisywania. Na tej podstawie stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa spełnia warunki określone w ustawie (z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie ze względu na wysoką wartość merytoryczną rozprawy wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej pani mgr Aleksandry KroczaK stosownym wyróżnieniem

dr hab. Anna Karnkowska

