PAN - Instytut Immunologii
Wpł. dnia 31-05-2016
L. dz. 230/16

Ocena

rozprawy na stopień naukowy doktora nauk przyrodniczych magister biotechnologii Karoliny Marek-Borowiec z Laboratorium i Zakładu Immunologii Nowotworów Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu pt.

Rola czynników *cis* i *trans* w regulacji poziomu ekspresji białka adaptorowego LAT.

Immunologia – nauka o odporności, przestaje być w XXI wieku nauką o obecności i funkcji komórek, ich receptorów, czy płynów biologicznych. Podobnie jak wiele innych dziedzin, wkroczyła w mikrokosmos molekuł białkowych i enzymatycznych, kwasów nukleinowych i ich fragmentów, wzajemnych oddziaływań, ekspresji etc. Pojęcie genomu i kodu genetycznego okazało się za wąskie dla wyjaśnienia złożonych zjawisk biologicznych. Coraz ważniejsze miejsce zajmuje obecnie fenomenologia epigenetyczna pozwalająca lepiej zrozumieć mechanizmy regulacji ekspresji genu. Białka histonowe tworzące wraz z DNA chromatynę jądrową, odpowiadają za funkcje regulatorowe epigenomu, wykazując dużą elastyczność na bodźce środowiska. Jednym z wielu genów kodujących białko o wyraźnych właściwościach regulacyjnych jest *LAT* (ang. Linker for Activation of T cells). Białko LAT, produkt tego genu pełni kluczową rolę w rozwoju komórek układu immunologicznego, głównie limfocytów T w pierwotnych i wtórnych narządach limfatycznych. Mechanizm działania tego białka, kooperacja z produktami innych genów w przebiegu aktywacji limfocytów T, zarówno normalnych jak i w stanach chorobowych – pozostają w dalszym ciągu niewyjaśnione na poziomie molekularnym. Kandydatka, mgr Karolina M-B. postanowiła zmierzyć się z tym wyzwaniem, korzystając z modelu 2 ludzkich linii komórkowych, Jurkat – ostrej białaczki limfoblastycznej T oraz jej pochodnej, mutantu JCaM2, w której doszło do braku ekspresji genu *LAT*. Celem badań było znalezienie przyczyn molekularnych deficytu genu LAT i identyfikacja czynników regulatorowych *cis* i *trans*,. niezbędnych dla właściwej regulacji transkrypcji *LAT*.

Wprowadzenie do Rozprawy, poprzedzone spisem treści i wykazem skrótów, jest kompetentnym przedstawieniem zagadnień będących przedmiotem badań, zrozumiałym nawet dla nieprzygotowanego czytelnika. Autorka omawia kolejno zasady i poziomy ekspresji genów, zagadnienie epigenomu i jego modyfikacje a zwłaszcza metylację i acetylację. Dużo miejsca poświęca regulacji ekspresji na poziomie transkrypcji. Dzieli czynniki regulatorowe na 2 grupy, *cis* i *trans*. Do *cis* zalicza promotory minimalne (rdzeniowe), sekwencje w ich pobliżu obecne w DNA jak motywy wyciszające/wzmacniające transkrypcję, insulatory oraz elementy naprowadzające. *Trans*

obejmują czynniki transkrypcyjne, modyfikowane histony, niekodujące małe RNA. Wynikiem oddziaływań pomiędzy *cis* i *trans* może być zarówno indukcja jak i represja sekwencji kodujących genomu. Autorka podkreśla złożony proces inicjacji transkrypcji, udział w nim kilkudziesięciu białek, interakcje czynników transkrypcyjnych z promotorami i enhancerami genowymi, werbowanie białek pomocniczych a zwłaszcza enzymów modyfikujących histony i remodulujące chromatynę przez czynniki transkrypcyjne. Właściwa synteza RNA jest następstwem interakcji polimerazy RNA z chromatyną. Kolejno, Kandydatka omawia translację,. wymienia jej 3 etapy, inicjację, elongację i terminację. Zwraca uwagę na złożoność tej ostatniej, wymagającej udziału 3 tripletów nukleotydowych i 3 czynników uwalniających, warunkujących oddysocjowanie nowo wytworzonego białka z rybosomu. Dużo uwagi poświęca genom o ekspresji tkankowo-specyficznej i hipotezom związanym z powstawaniem białek o tych cechach. Z danych NGS (next generation sequencing) wynika, że chromatyna tych genów różni się od innych wzorem modyfikacji histonów, metylacją, obecnością niestabilnych cząsteczek nukleosomów itp. Następnym omawianym zagadnieniem Wstępu jest problem zmian profilu ekspresji genów w trakcie rozwoju i aktywacji limfocytów T. Kandydatka słusznie zaczyna wywód od macierzystych komórek hematopoetycznych i od roli cytokin w wyborze ścieżki różnicowania komórek i podaje, że w procesie tym bierze udział co najmniej 50 czynników transkrypcyjnych. Ciekawym stwierdzeniem jest informacja (szkoda, że nie poparta pozycją piśmiennictwa), że prekursory limfocytów T (CLP – common lymphoid progenitors) mają potencjał różnicowania się również w komórki dendrytyczne i monocyty. Rozwój limfocytów T w grasicy omówiony jest szczegółowo z uwzględnieniem czynnika transkrypcyjnego NOTCH1 i kolejnych stadiów DN (double negative) komórek T.

Końcową część Wstępu Kandydatka poświęciła roli białek adaptorowych a w szczególności białka LAT w funkcjonowaniu limfocytów T. Białka adaptorowe , nie mające aktywności enzymatycznej, są obecnie uważane za łączniki molekularne między receptorami powierzchni komórki a cząsteczkami warunkującymi wewnątrzkomórkową transdukcję sygnału. Wśród wielu białek adaptorowych LAT wyróżnia się tym, że pierwszy ulega aktywacji po sygnale z receptora TCR i po fosforylacji reszt tyrozynowych przez kinazę ZAP-70. Wchodzi w interakcję z wieloma białkami tworząc kompleksy białkowe niezbędne dla dalszego przekazu sygnału aktywacji. Warto tu dodać, że zidentyfikowano wiele innych białek adaptorowych jak SLP-76, NCK i inne, ale LAT jest obecnie najlepiej poznanym. Autorka przytacza dane z badań na myszach, z których wynika, że zwierzęta *LAT-/-* są całkowicie

pozbawione dojrzałych limfocytów T. Dysfunkcja genu *LAT* spowodowana zastąpieniem kodonu tyrozyny kodonem fenyloalaniny prowadzi natomiast do silnej proliferacji limfocytów TCD4+ o fenotypie Th2, sekrecji cytokin prozapalnych i produkcji autoprzeciwciał przez limfocyty B. Powyższe dane stały się przyczyną dużego zainteresowania problematyką białka LAT w odniesieniu do ludzkich chorób autoimmunizacyjnych i zapalnych takich jak toczeń układowy, reumatoidalne zapalenie stawów czy astma.

W zakończeniu Wstępu Kandydatka krótko scharakteryzowała czynniki transkrypcyjne działające jako pozytywne/lub negatywne regulatory białka LAT a także czynniki wywołujące jego ekspresję jak ester forbolu (PMA) czy przeciwciało anty-CD3. Wspomniany wcześniej Cel badań został uzupełniony o poszukiwanie przyczyn zjawiska reekspresji białka LAT w stymulowanych przez PMA komórkach JCaM2, pozbawionych w wyniku mutacji jego ekspresji.

Materiały i Metody rozprawy są rozbudowane i w pełni zgodne ze współczesną wiedzą i praktyką biologii molekularnej. Sekwencjonowanie genu *LAT* zostało powiązane z analizą *in silico* konsekwencji jego mutacji. Dla analiz reporterowych Autorka stworzyła panel dziewięciu konstruktów posiadających fragmenty sekwencji genomowej genu *LAT*. Korzystała szeroko z dostępnych publicznie zbiorów danych z projektów sekwencjonowania nowej generacji (NGS) w bazie GEO oraz na serwerze ENCODE.

Wyniki zawierają bardzo dużo nowych informacji. Sekwencjonowanie plazmidów z fragmentem, genu *LAT* z komórek Jurkat i JCaM2 pozwoliło na wykrycie 2 mutacji w genie *LAT* komórek JCaM2, nieobecnych w komórkach Jurkat. Korzystając z analizy *In silico*, Autorka wykazała, że wykryte mutacje znajdują się w miejscach genu o sekwencji konsensusowej dla białek – aktywatorów transkrypcji. Na podstawie testów reporterowych z użyciem plazmidów mających wklonowany intron z mutacją punktową, wykazano, że obecność mutacji powoduje spadek aktywności promotora o 50%, co może tłumaczyć break ekspresji białka LAT w zmutowanych komórkach.

Przebadano także profile interakcji białek białek regulatorowych z sekwencją genu *LAT* i *LAT2* obecnego w linii B-komórkowej. W przypadku linii T-komórkowej (Jurkat) aktywność transkrypcyjna znajduje się głównie w obrębie sekwencji promotora proksymalnego o zwiększonej wrażliwości na cięcie DNA-azą I, w przeciwieństwie do linii B-komórkowej mającej gen *LAT2*.

Ciekawą obserwacją było spostrzeżenie, że kwas walproinowy, znany lek antyepileptyczny działa hamująco na ekspresję LAT indukowaną PMA, na etapie regulacji transkrypcji. Wykazano także ważną rolę tzw. białek SP, pełniących funkcję czynników transkrypcyjnych, w aktywności promotora proksymalnego. Ich inaktywacja obniżała aktywność promotora o 50%. Świadczyło to razem, o dużej złożoności mechanizmów odpowiedzialnych za ekspresję LAT w komórce.

Dyskusja jest stosunkowo krótka ale charakteryzująca w kompetentny sposób uzyskane wyniki w konfrontacji z danymi z piśmiennictwa. Sześć wniosków pracy trudno nazwać wnioskami, bo są to ogólne stwierdzenia będące podsumowaniem wyników. „Wnioski" 2 i 4 są bardzo podobne, dotyczą poznania nowych czynników regulatorowych (*cis* i *trans*) i mogą być zastąpione jednym zdaniem.

Piśmiennictwo liczy 216 pozycji, jest bardzo dobrze dobrane, całkowicie anglojęzyczne i jak najbardziej odpowiadające współczesnej wiedzy. Kilkunastu cytowanych autorów w tekście pracy nie mogłem jednak znaleźć w spisie piśmiennictwa. Ponadto, wydaje się, że tytuł rozprawy akcentujący rolę czynników *cis* i *trans* w regulacji poziomu ekspresji białka LAT jest niezupełnie zgodny z całokształtem badań, których zakres jest znacznie szerszy.

Pomimo tych drobnych formalnych uwag krytycznych całość rozprawy oceniam bardzo wysoko ze względu na ważność tematu, wysoki i w pełni aktualny poziom warsztatu badawczego a także intelektualną dojrzałość Autorki, widoczną choćby w powszechnym korzystaniu z 10 źródeł internetowych w tworzeniu nowych idei i koncepcji badawczych.

Stawiam wniosek do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu o dopuszczenie mgr Karoliny Marek-Bukowiec do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie postuluję wyróżnienie pracy.

Żeromski

Prof. zw. dr hab. med. Jan Żeromski

Poznań, 20 maja 2016 r