

Dr hab. Andrzej Rapak



**INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ**  
**im. Ludwika Hirszfelda**  
Polska Akademia Nauk

ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław  
tel. (071) 337 11 72, (071) 337 12 75, fax: (071) 337 13 82

<http://immuno.iitd.pan.wroc.pl>

Wrocław, 25.04.2018

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgra inż. Mikołaja Kłossowicza pt. „Ograniczona proteoliza białka adaptorowego LAT: nowy mechanizm regulacji sygnalizacji wewnątrzkomórkowej limfocytów T”.**

Przedstawiona do recenzji rozprawa dotyczy badań strukturalnych i funkcjonalnych białka adaptorowego LAT, które jest częścią złożonego kompleksu związanego z receptorem TCR. LAT jest cytoplazmatycznym białkiem zakotwiczonym w błonie komórkowej, jego aktywność regulowana jest w wyniku modyfikacji potranslacyjnych: palmitynacji, fosforylacji i ubikwitynacji. W zależności od typu przyłączonych białek sygnałowych LAT może pozytywnie lub negatywnie regulować receptor TCR. Obecność białka adaptorowego LAT jest krytyczna dla rozwoju i aktywacji limfocytów T. U myszy z nokautem białka LAT stwierdzono zatrzymanie dojrzewania tymocytów na etapie komórek podwójnie negatywnych DN i brak dojrzałych limfocytów na obwodzie. Dane literaturowe wskazywały, że białko LAT może ulegać częściowej degradacji przy pomocy kaspaz. Właśnie to zagadnienie Doktorant postanowił w swojej pracy dogłębnie zbadać. Drugim celem pracy było określenie wpływu dodatkowej sekwencji aminokwasowej w białku LAT związanej z obecnością intronu 6 na proces degradacji izoformy LATi6.

Przedstawiona do oceny praca jest bardzo obszerna, obejmuje 195 stron maszynopisu i ma typowy układ przyjęty dla rozpraw doktorskich. Zawiera 4 główne rozdziały: wstęp (47 stron), materiały i metody (40 stron), wyniki (33 stron) oraz dyskusję i wnioski (20 stron). Doktorant zamieścił również spis treści, wykaz skrótów, listę własnych publikacji i komunikatów zjazdowych oraz źródła finansowania, streszczenie pracy w języku polskim i

angielskim oraz cel pracy. Na końcu pracy umieszczono cytowane piśmiennictwo liczące 278 pozycji oraz listę rycin i tabel.

Praca powstała w ramach dwóch projektów grantowych Narodowego Centrum Nauki oraz projektu unijnego GrantPlus, otrzymanego przez Doktoranta. Wyniki pracy zostały opublikowane w trzech czasopismach z listy filadelfijskiej o łącznym współczynniku Impact Factor wynoszącym 8,66. W dwóch publikacjach Doktorant jest pierwszym autorem, w trzeciej drugim. Rezultaty pracy przedstawiono również na czterech konferencjach międzynarodowych..

Praca napisana jest poprawnym językiem i dobrze zredagowana. Zawiera tylko nieliczne błędy edytorskie;

Str. 25 indukują produkcji powinno być indukują produkcję

Str. 26 odwód powinno być obwód

Str. 27 nierecetoprowe powinno być niereceptorowe

Str. 27 inicjuję powinno być inicjuje

Str. 28 z taka powinno być z taką

Str. 31 przezbłonowym powinno być transmembranowym

Str. 120 obiema izoform powinno być obiema izoformami

Str. 151 tych oddziaływania powinno być tych oddziaływań

Słowo „ubikwitynacja” używane jest zamiennie z „ubikwitylacja”. To drugie określenie jest mniej poprawne.

W opisie skrótów brak jest polskich objaśnień.

W pozycjach literaturowych 197 i 203 brak jest stron lub numeru doi.

W obszernym wstępie Doktorant szczegółowo opisał mechanizmy przekazywania sygnału poprzez receptor TCR, rolę różnych białek adaptorowych zaangażowanych w ten proces. Dokładnie opisano budowę i funkcję białka LAT oraz procesy apoptozy i degradacji białek zachodzące w komórkach. Duża liczba cytowanego piśmiennictwa świadczy o dobrym rozeznaniu tematyki pracy przez Doktoranta. Niektóre rozdziały nie powiązane bezpośrednio z tematem pracy zostały zbyt obszernie opisane.

Do realizacji zaplanowanych badań Doktorant dobrał odpowiednie techniki biologii molekularnej i komórkowej, które zostały opisane w sposób szczegółowy i klarowny. Badania przeprowadzono na mysich tymocytach, mysich i ludzkich komórkach PBMC, oraz ludzkich liniach komórkowych Jurkat, JCaM2, HEK293T i mysich liniach NIH3T3 oraz VLC3-3M2.

Jedyna krytyczna uwaga dotyczy braku danych statystycznych. W opisie metod, jak również w opisie wyników nie podano, czy i ile razy doświadczenia były powtarzane.

Omówienie wyników rozpoczęto od analizy ekspresji rzadko występującej wydłużonej izoformy genu LAT zawierającej intron 6. Nie wykryto takiej izoformy w komórkach PBMC myszy, natomiast występowała u człowieka, psa, kota i świni. Co ciekawe u bydła występuje wyłącznie transkrypt zawierający zachowany intron 6. Wykazano, że ekspresja izoformy LATi6 związana jest z występowaniem powtórzeń guaninowych GGG wewnątrz intronu 6.

Metodą western blotting wykryto funkcjonalne białko LATi6 w komórkach HEK293T transfekowanych genem LATi6, a w transfekowanych komórkach JCaM2 metodą mikroskopii konfokalnej pokazano, że izoforma LATi6 związana jest błoną komórkową podobnie jak kanoniczna forma białka LAT. Kolejne doświadczenia pokazały, że izoforma LATi6 jest w pełni funkcjonalną formą zdolną do przekazywania sygnału poprzez receptor TCR, ulegała ona jednak szybszej degradacji pod wpływem czynników apoptotycznych w porównaniu z kanoniczną formą LAT.

Badania procesu degradacji przeprowadzono na mysich tymocytach oraz naiwnych i aktywowanych limfocytach T traktowanych różnymi czynnikami proapoptotycznymi. Do analizy wykorzystano dwa różne przeciwciała anty LAT. Przeciwciało rozpoznające N-końcowy fragment białka LAT było użyteczne w metodzie western blotting i pokazywało niskocząsteczkowe produkty degradacji. Natomiast przeciwciało przeciwko C-końcowemu fragmentowi rozpoznawało wyłącznie pełną cząsteczkę LAT i pokazywało obniżenie ekspresji LAT w wyniku procesu degradacji. To drugie przeciwciało Doktorant wykorzystał do opracowania bardzo czułej metody monitorowania procesu degradacji przy użyciu cytometrii przepływową. Pokazano, że proces degradacji białka LAT najintensywniej przebiega w tymocytach a fosforylacja tyrozyn w białku LAT chroni je przed degradacją.

W celu identyfikacji proteaz biorących udział w procesie degradacji użyto kilku specyficznych inhibitorów. Otrzymane wyniki wskazywały na udział kaspaz i proteaz serynowych, możliwie kaspazy 8 i/lub granzymu B. Doktorant nie potwierdził jednak takiej możliwości innymi metodami oznaczając np. w komórkach obecność aktywnych form kaspaz i granzymów metodą western blotting lub ELISA.

Włączenie analizy degradacji białka LAT do wieloparametrowej cytometrii przepływową pozwala na identyfikację bardzo nielicznych subpopulacji komórek. W celu sprawdzenia przydatności nowo opracowanej metody w praktyce, badano proces degradacji białka LAT w komórkach T regulatorowych. Pokazano, że prekursorzy komórek Treg o fenotypie

CD4<sup>+</sup>CD8<sup>low</sup>FoxP3<sup>+</sup> są odporne na degradację białka LAT indukowaną przeciwciałem anty CD3.

W dziale Dyskusja i wnioski otrzymane przez Doktoranta wyniki zostały poddane obszernej i wnikliwej analizie. Doktorant konfrontuje własne wyniki z wynikami otrzymanymi przez innych autorów i wysuwa odpowiednie wnioski. Wskazuje również na te elementy pracy, które mogą być rozwijane w dalszych badaniach. Dyskusja zakończona jest krótkim podsumowaniem najważniejszych osiągnięć pracy, do których należą: wykazanie obecności w pełni funkcjonalnej izoformy białka LATi6 oraz poszerzenie wiedzy na temat częściowej degradacji białka LAT. Otrzymane wyniki są oryginalne i przyczyniły się do lepszego poznania mechanizmów zachodzących podczas dojrzewania i aktywacji komórek T.

Chciałbym prosić Doktoranta o ustosunkowanie się do kilku kwestii:

- czy rozważana była możliwość udziału w degradacji białka LAT katepsyn i kalpain
- udział granzymu B jest możliwy tylko w obwodowych komórkach T. W grasicy stwierdzono obecność mRNA dla granzymu B jedynie we wczesnej populacji tymocytów podwójnie negatywnych
- izoforma LAT z intronem 6 w niektórych komórkach stanowi jedynie kilka procent kanonicznej formy LAT i wykazuje krótszy czas półtrwania. Czy faktycznie może mieć dominujący wpływ na szlaki sygnałowe w komórce?
- obecność funkcjonalnego białka LATi6 pokazano metodą WB w transfekowanych komórkach JCaM2 i HEK293T. Dlaczego nie udało się tego pokazać w komórkach Jurkat i mysich tymocytach i ludzkich komórkach PBMC?

Podsumowując należy stwierdzić, że Doktorant zrealizował postawione cele, a otrzymane wyniki zostały opublikowane. Wykazał się bardzo dobrą znajomością tematu i opanowaniem nowoczesnych technik badawczych.

Na uwagę zasługuje opracowana przez Doktoranta nowa szybka metoda oznaczania degradacji białka LAT na żywych komórkach przy użyciu cytofluorymetru przepływowego, która mogłaby znaleźć zastosowanie w diagnostyce niektórych nowotworów i chorób autoimmunologicznych. Degradacja białka LAT może być również wykorzystana jako marker wczesnej apoptozy oraz do identyfikacji niektórych populacji komórek T.

Przedstawiona do recenzji praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim zarówno pod względem formalnym jak i merytorycznym i dlatego stawiam wniosek do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu o dopuszczenie Pana mgra inż. Mikołaja Kłossowicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Równocześnie wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.



Dr hab. Andrzej Rapak

