

## Ocena rozprawy

na stopień naukowy doktora nauk przyrodniczych mgr inż. Łukasza Śnieżewskiego z Laboratorium Immunologii Molekularnej i Komórkowej Zakładu Immunologii Nowotworów Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu pt.

### **„Charakterystyka aktywności promotora genu *NWC* u wybranych przedstawicieli kręgowców”.**

Molekularne podstawy powstawania specyficznej odpowiedzi immunologicznej należą do kluczowych problemów współczesnej immunologii podstawowej. Na złożoność tego zagadnienia składa się kilka aspektów, zresztą powiązanych ze sobą. Po pierwsze, dążenie do coraz bardziej precyzyjnego rozpoznania i eliminacji z ustroju obcych struktur było ściśle powiązane z rozwojem i ewolucją różnych gatunków zwierząt. Po drugie, zwalczanie patogenów zewnątrzkomórkowych vs. wewnątrzkomórkowych wymagało innego podejścia gospodarza, ale zapewnienia tej samej swoistości wobec intruza. Po trzecie, zmienność patogenów, pojawianie się nowych mikroorganizmów dotąd nie występujących w świecie ożywionym, stwarzało konieczność plastyczności systemu odpornościowego, w tym jego zdolności do rozpoznawania cech fenotypowych dotąd całkowicie nieznanymi. Jednocześnie istniała presja stosunkowo szybkiego rozwiązania tego „conundrum”, gdyż groziło to wyginięciem gatunków nieprzystosowanych do swojej obrony. Nie ulega wątpliwości, że szereg gatunków zwierząt zostało wyeliminowanych z królestwa fauny właśnie z powodu braku przystosowania.

Mgr Łukasz Śnieżewski podjął trudne zadanie mające na celu wyjaśnienie na poziomie molekularnym, jakie czynniki warunkowały powstanie, różnorodność i skuteczność kluczowych narzędzi swoistości, czyli receptorów dla antygenów, w przebiegu ewolucji. Z wcześniejszych badań wiadomo było, że za zmienność tego receptora odpowiedzialne są geny *RAG-1* i *RAG-2* (recombination-activating genes). Kodują one podjednostki rekombinazy *V(D)J*, która prowadzi do przegrupowania (rearanżacji) segmentów genów *V(D)J* kodujących przeciwciała i receptory limfocytów T. Geny te znajdują się w bardzo bliskiej odległości od innego genu *NWC*. Wiele danych przemawia natomiast, że geny *RAG* mają cechy transpozonu (genu wędrującego), który integrował się w miejsce o wysokim potencjale do aktywacji transkrypcji. Kandydat postanowił więc przebadać, czy promotor genu *NWC* ma właściwości promotora dwukierunkowego i czy jest to cecha konserwowana w ewolucji gatunków.

Wstęp pracy wprowadza czytelnika w arkana budowy immunoglobulin i receptora dla antygenów limfocytów T. Autor szczegółowo omawia domenową budowę białek *RAG-1* i *RAG-2* oraz molekularne mechanizmy ich aktywności. Dużo miejsca poświęca genom *RAG-1* i *RAG-2* oraz regulacji ich ekspresji. Uzasadnia i poświadcza transpozonowe pochodzenie tych genów przez porównanie do dobrze poznanych transpozonów *Transib*. Omawia także inne rodzaje transpozonów oraz mechanizmy zapobiegające zaburzeniom integralności genomu związane z ich obecnością. Najkorzystniejszą opcją dla ustroju jest integracja transpozonu z genomem gospodarza w orientacji głowa do głowy (head-to head), ale w sąsiedztwie innego genu mającego promotor dwukierunkowy. Zapobiega to tzw. wyciszeniu epigenetycznemu. Końcowa część Wstępu jest poświęcona genowi *NWC*. Ekspresja tego genu u myszy jest najwyższa w jądrach oraz w mózgu. O jego związkach z *RAG* świadczy powstawanie

w dojrzewających limfocytach T transkryptów hybrydowych *RAG-1/NWC*. Autor zwraca także uwagę na wysoką konserwację ewolucyjną genu *NWC* w świecie zwierząt. Poza kręgowcami ortologami tego genu wykryto u wielu gatunków bezkręgowców. Interesujący jest również fakt, że gen *NWC* nie stworzył genu hybrydowego z genami *RAG*, zachowując pełną niezależność tych ostatnich.

W podsumowaniu Wstępu należy stwierdzić, że stanowi on bardzo dobre i zrozumiałe wprowadzenie do dalszych etapów rozprawy.

Cel pracy – faktycznie dotyczy dwóch zagadnień. Pierwsze to zbadanie, czy promotor genu *NWC* ma istotnie cechy aktywności dwukierunkowej, oraz czy ta cecha jest konserwowana w ewolucji. Drugie – to ocena ekspresji różnych właściwości homologów genu *NWC* u wybranych przedstawicieli kręgowców w tym u człowieka. Materiały i Metody – stanowią największą objętościowo część rozprawy, liczą 36 stron. Stanowi to jednak zaletę pracy, gdyż pośrednio świadczy to o wszechstronnym podejściu technicznym autora do realizacji postawionych celów, a także o Jego pracowitości. Opisy wszystkich użytych technik są dokładne i ilustrowane przejrzystymi schematami. W osobnej tabeli podano zestawienie wszystkich starterów oligonukleotydowych użytych w reakcjach PCR.

W Wynikach Kandydat wykazał aktywność dwukierunkową promotora genu *NWC* przez uzyskanie fragmentów promotora w reakcji PCR, ich klonowanie i selekcję klonów pozwalającą na określenie kierunku aktywności promotorowej. Przeprowadzono także analizę delecyjną promotora dla ustalenia, które jego fragmenty warunkują aktywność. Wykazano również oddziaływanie czynnika transkrypcyjnego Zfp 143 z badanym promotorem mysim. Stanowiło to pośredni dowód dwukierunkowości promotora, bo wspomniany czynnik transkrypcyjny jest odpowiedzialny za regulację aktywności promotorów dwukierunkowych.

Kolejnym etapem badan Autora była ocena organizacji locus genów *RAG/NWC* u przedstawicieli 3 gatunków kręgowców – *Homo sapiens*, *Xenopus tropicalis* i *Danio rerio*, wybranych ze względu na znaną kompletną sekwencję genomu. W odniesieniu do wspomnianych 3 gatunków ustalono geny będące ortologami mysiego genu *NWC* a także obecność i aktywność dwukierunkowego promotora *NWC*. Promotory te wykazywały reaktywność z czynnikiem transkrypcyjnym Zfp143. Ekspresję genu *NWC* wykazano w wielu narządach badanych 3 kręgowców. Ponadto przeprowadzono sekwencjonowanie promotorów *NWC* i wyznaczono punkty startu transkrypcji genu *NWC* u omawianych gatunków. Stwierdzono wysoką homologię struktury, aktywności i funkcji omawianych promotorów *NWC* z promotorem mysim.

Dyskusja jest stosunkowo krótka i zawiera 2 główne przesłania. Pierwsze dotyczy występowania genów o cechach podobnych do transpozonów w świecie zwierząt, zarówno kręgowców jak i bezkręgowców. I tak np. transpozony rodziny *Transib* występują u wielu gatunków bezkręgowców i kodują białka podobne do *RAG*. Niejasna jest historia ewolucyjna transpozonu *RAG*, gdyż jego występowanie nie jest regularne u zwierząt na różnym szczeblu rozwoju filogenetycznego. Autor wymienia 2 hipotezy będące próbą wyjaśnienia tego zjawiska, transmisję wertykalną zakładającą, że różna lokalizacja transpozonu zależała od włączenia do pierwotnego transpozonu *Transib* genu podobnego do *RAG-2* i transmisję horyzontalną polegającą na niezależnej integracji transpozonu *RAG* do genomów różnych organizmów w czasie ewolucji.

Pracę kończą Podsumowanie i Wnioski. W tym pierwszym Autor wymienia cechy genu promotora *NWC*, konserwowane w przebiegu ewolucji. W odniesieniu do Wniosków najważniejszy wydaje się wniosek 4. Według autora, jedna z integracji transpozonu *RAG*

w *locus* genu *NWC* w przebiegu ewolucji doprowadziła do powstania odporności adaptacyjnej.


Rozprawa zawiera 131 stron, 37 rycin i 18 tabel. Na końcu znajduje się załącznik z sekwencjami genomowego DNA *Xenopus tropicalis*. Piśmiennictwo obejmuje 116 pozycji, w tym z najnowszych danych, bardzo dobrze dobranego do treści pracy. Zwraca uwagę fakt, że w 3 pozycjach piśmiennictwa współautorem jest mgr Śnieżewski. Świadczy to dobrze o kompetencjach merytorycznych Kandydata do podjęcia tematu rozprawy. Do drobnych uwag krytycznych zaliczam:

1. Brak schematu genomowej organizacji genów kodujących łańcuchy  $\gamma$  i  $\delta$  receptora TCR (jak na Ryc. 4 dla łańcuchów  $\alpha$  i  $\beta$ ).
2. Ryc. 13 - brak referencji piśmiennictwa
3. Materiał i Metody: brak ogólnego schematu doświadczeń pomijającego szczegóły techniczne procedur laboratoryjnych.
4. W Wynikach zwykle nie cytuje się pozycji piśmiennictwa.

Pomimo tych uwag rozprawę oceniam bardzo wysoko ze względu na szerokie podejście do tematu, wnikliwe podejście do związków z ewolucją, bardzo bogaty warsztat badawczy i narrację zrozumiałą dla czytelnika nie zaangażowanego w opisywanej problematyce.

Stawiam wniosek do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu o dopuszczenie mgr. Inż. Łukasza Śnieżewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie postuluję wyróżnienie rozprawy.

Poznań, 5 kwietnia 2018 r.

  
Prof. zw. dr hab. med. Jan O. Żeromski