

Prof. dr hab. Barbara Płytycz
Emerytowany profesor zwyczajny Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych UJ
Profesor zwyczajny Małopolskiej Wyższej Szkoły im. J. Dietla
barbara.plytycz@uj.edu.pl

Kraków, 11 kwietnia 2018

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Łukasza Śnieżewskiego
zatytułowanej „Charakterystyka aktywności promotora genu *NWC* u
wybranych przedstawicieli kręgowców”**

Od kilku lat mam zaszczyt opiniować prace dotyczące genu *NWC* odkrytego, w sąsiedztwie genów *RAG*, przez wrocławski Zespół profesora Pawła Kisielowa. Poprzednio miałam okazję docenić wkład dr hab. Małgorzaty Cebrat w poznanie struktury i funkcji tego genu, a obecnie zapoznałam się z osiągnięciami jej doktoranta, Pana Łukasza Śnieżewskiego. Doktorant jest już współautorem ośmiu oryginalnych prac naukowo-badawczych z bazy PubMed (patrz poniżej), spośród których cztery (podświetlone) dotyczą genu *NWC*. W najnowszej z tych prac (2018) Pan Ł. Śnieżewski jest pierwszym autorem, zwyczajowo odpowiedzialnym za zgromadzenie wszystkich danych i przygotowanie pierwszej wersji tekstu.

Autorzy (Kisielow, Miazek, Cebrat) pierwszej pracy (2008) dotyczącej genu *NWC*, powiązali jego aktywność z sąsiadującymi genami *RAG* (Recombination Activating Genes) odpowiedzialnymi za generowanie różnorodności receptorów limfocytów B i T (Generators of Diversity - GOD). Już wówczas przypuszczano, że geny *RAG* są mobilnymi elementami genetycznymi – transpozonomi. Kolejne lata poszerzyły wiedzę na temat transpozonów, które w genomie gospodarza mogą ulec wyciszeniu jako potencjalnie szkodliwe, albo „udomowieniu”, czemu sprzyja ich integracja z fragmentem DNA o aktywności transkrypcyjnej. Spośród przebadanych pod tym kątem gatunków - geny *RAG* występują u szkarłupni, lancetnika i żuchwoców, lecz tylko u tych ostatnich doszło do integracji i udomowienia transpozonu *RAG* w locus genu *NWC*, czemu mogła sprzyjać dwukierunkowa aktywność promotora tego genu. Zadaniem Pana Łukasza Śnieżewskiego była właśnie charakterystyka aktywności promotora genu *NWC* u wybranych przedstawicieli kręgowców.

1: Śnieżewski L, Janik S, Laszkiewicz A, Majkowski M, Kisielow P, Cebrat M. The evolutionary conservation of the bidirectional activity of the *NWC* gene promoter in jawed vertebrates and the domestication of the *RAG* transposon. *Dev Comp Immunol.* 2018 Apr;81:105-115. doi: 10.1016/j.dci.2017.11.013.

- 2: Janik S, Nowak U, Łaszkiewicz A, Satyr A, Majkowski M, Marchwicka A, **Śnieżewski L**, Berkowska K, Gabryś M, Cebrat M, Marcinkowska E. Diverse Regulation of Vitamin D Receptor Gene Expression by 1,25-Dihydroxyvitamin D and ATRA in Murine and Human Blood Cells at Early Stages of Their Differentiation. *Int J Mol Sci*. 2017 Jun 21;18(6). pii: E1323. doi: 10.3390/ijms18061323.
- 3: Zareba J, Blazej P, Łaszkiewicz A, **Śnieżewski L**, Majkowski M, Janik S, Cebrat M. Uneven distribution of complementary sex determiner (*csd*) alleles in *Apis mellifera* population. *Sci Rep*. 2017 May 24;7(1):2317. doi: 10.1038/s41598-017-02629-9.
- 4: Marchwicka A, Cebrat M, Łaszkiewicz A, **Śnieżewski L**, Brown G, Marcinkowska E. Regulation of vitamin D receptor expression by retinoic acid receptor alpha in acute myeloid leukemia cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016 May;159:121-30. doi: 10.1016/j.jsbmb.2016.03.013.
- 5: Kasztura M, **Śnieżewski L**, Łaszkiewicz A, Majkowski M, Kobak K, Peczek K, Janik S, Kapusniak V, Miazek A, Cebrat M, Kisielow P. Search for the Function of NWC, Third Gene Within RAG Locus: Generation and Characterization of NWC-Deficient Mice. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2016 Aug;64(4):311-9. doi: 10.1007/s00005-015-0379-1.
- 6: Łaszkiewicz A, Bzdion Ł, Kasztura M, **Śnieżewski L**, Janik S, Kisielow P, Cebrat M. Ikaros and RAG-2-mediated antisense transcription are responsible for lymphocyte-specific inactivation of NWC promoter. *PLoS One*. 2014 Sep 8;9(9):e106927. doi: 10.1371/journal.pone.0106927.
- 7: Marchwicka A, Cebrat M, Sampath P, **Śnieżewski L**, Marcinkowska E. Perspectives of differentiation therapies of acute myeloid leukemia: the search for the molecular basis of patients' variable responses to 1,25-dihydroxyvitamin d and vitamin d analogs. *Front Oncol*. 2014 May 27;4:125. doi: 10.3389/fonc.2014.00125.
- 8: Łaszkiewicz A, **Śnieżewski L**, Kasztura M, Bzdion L, Cebrat M, Kisielow P. Bidirectional activity of the NWC promoter is responsible for RAG-2 transcription in non-lymphoid cells. *PLoS One*. 2012;7(9):e44807. doi: 10.1371/journal.pone.0044807

Praca doktorska Pana mgra Łukasza Śnieżewskiego, obejmująca 132 strony maszynopisu, ma układ tradycyjny. Po streszczeniu polsko- i anglojęzycznym pojawia się wykaz 66 używanych w niej skrótów z rozwinięciem angielskim i polskim, a następnie spis treści. „Wstęp” (str. 15-35), ilustrowany 13 bardzo czytelnymi schematami, przypomina strukturę i funkcję receptorów rozpoznających antygeny przez limfocyty T i B, oraz przebieg rearanżacji genów *V(D)J* warunkującej ogromne zróżnicowanie tych receptorów, a także właściwości i transpozonowe pochodzenie genów *RAG-1* i *RAG-2* odpowiedzialnych za proces rearanżacji. Pojawiają się tu podrozdziały o genie *NWC*, jego ewolucyjnej konserwacji i lokalizacji względem genu *RAG-1/-2*. Na takim tle przedstawiono „Cel” badań (str. 36), którym była odpowiedź na pytanie, czy promotor genu *NWC* posiada aktywność dwukierunkową oraz czy jest ona cechą konserwowaną ewolucyjnie, oraz wypunktowano cele szczegółowe, mianowicie: 1) poszukiwanie ekspresji homologów genu *NWC* w tkankach i liniach komórkowych gatunków zuchwowców o poznanych sekwencjach genomu: myszy *Mus musculus*, człowieka *Homo sapiens*, żaby pazurzastej *Xenopus tropicalis* i danio przegowanego *Danio rerio*; 2) wyznaczenie punktu startu transkrypcji tych genów; 3) analizę aktywności ich

promotorów (w tym ustalenie kierunku działania); 4) udział homologów czynnika transkrypcyjnego ZFP143 w regulacji aktywności promotorów.

„Materiały i metody” zaprezentowano w sposób wzorowy (str. 37-73), co dowodzi, że Autor opanował wiele technik molekularnych i ma znakomite umiejętności bioinformatyczne. W „Wynikach” (str. 74-101) udokumentowano szczegółowo i krytycznie realizację celów badań, przy czym zwraca uwagę bardzo staranne przygotowanie Rycin i Tabel. Narzędzia molekularne oraz istniejące bazy danych były wystarczające do analiz u myszy i człowieka, natomiast w przypadku *X. tropicalis* konieczne było zsekwencjonowanie promotora genu *xtNWC*, którą to sekwencję zdeponowano w bazie GenBank i umieszczono w „Załączniku” pracy (str. 131-132). W przypadku *D. rerio*, niewysoki poziom transfekcji komórek linii ZF4 uniemożliwił uzyskanie wiarygodnych danych o udziale czynnika transkrypcyjnego w regulacji promotora genu *drNWC*.

Pomimo przeszkód natury technicznej udowodniono, że u badanych gatunków zuchwowców promotory genu *NWC* cechują się dwukierunkową aktywnością i wskazano sekwencje kluczowe dla ich działania, rozpoznawane przez czynnik transkrypcyjny Zfp143/ZNF143 (str. 100).

Pracę wieńczy bardzo dobrze napisana „Dyskusja” (str. 102-112) z dwoma znakomitymi schematami (ryc. 36 i 37), która koncentruje się na ewolucyjnych aspektach integracji transpozonu *RAG* z genami gospodarza oraz regulacji ekspresji genów w locus *RAG/NWC*. Po niej następuje zwięzłe „Podsumowanie i wnioski” (str. 113), 116 pozycji „Piśmiennictwa” oraz „Spis (37) rycin i (18) tabel”.

Praca doktorska Pana Łukasza Śnieżewskiego jest zredagowana bardzo starannie. Z obowiązku wskażę, że na stronie 5 powinna się pojawić kursywa przy genach *V(D)J*, a przy pierwszym użyciu nazw łacińskich badanych gatunków powinny być użyte ich pełne nazwy, rodzajowa i gatunkowa, a więc *Mus musculus*, *Homo sapiens*, *Xenopus tropicalis* i *Danio rerio*. Na stronie 37 powinno być napisane, że *Xenopus tropicalis* jest przedstawicielem RODZAJU *Xenopus* (nie „gatunku *Xenopus*”).

W Dyskusji Autor poświęca sporo uwagi informacjom o homology genu *NWC* u intrygującego gatunku płaskowca, *Trichoplast adhaerens* i na str. 108 pisze: „Ustalenie

charakteru aktywności promotora homologa genu *NWC* u organizmu bezkręgowego uzupełniłoby obraz przedstawiany w niniejszej pracy. Niewykluczone, że ta tematyka badawcza zostanie podjęta dla innego modelu bezkręgowca.” Zapewne Autor ma na myśli gatunki o dobrze poznanym genomie, czyli *Drosophila melanogaster* czy *Caenorhabditis elegans*, jednak nie mogę się oprzeć chęci podsunęcia wrocławskiemu Zespołowi bezkręgowca, którego brak na drzewie filogenetycznym z Ryciny 36, a mianowicie dżdżownicy kompostowej *Eisenia andrei*, przedstawiciela pierścienic (Annelida). Jest to gatunek o zsekwencjonowanej dużej części genomu, bardzo łatwy w hodowli i atrakcyjny dla przedstawicieli wielu dyscyplin naukowych (np. patrz Swiderska et al. DCI 67: 404-412, 2017; doi: 10.1016/j.dci.2016.08.011; Plytycz et al. PLoS One, January 25, 2018, doi.org/10.1372/journal.pone.0191711). W razie zapotrzebowania - z przyjemnością służę okazami tego gatunku i wskazówkami praktycznymi.

W trakcie przygotowywania niniejszej rozprawy i związanych z nią publikacji, Autor nabył wiedzę i umiejętność pracy z żabą szponiastą *Xenopus tropicalis* oraz linią komórkową XTC-2 wyprowadzoną od okazu innego gatunku płaza, *Xenopus laevis*. Ośmielam się sugerować, by te umiejętności spożytkować dla dołożenia wrocławskiej cegiełki do monumentalnego dzieła opublikowanego w Nature (patrz poniżej) na temat ewolucji allotetraploidalnego genomu *Xenopus laevis*. Uważa się, że diploidalny przodek *X. tropicalis* był protoplastą wielu gatunków rodzaju *Xenopus* różniących się ploidalnością, aż do 12 powtórzeń u dodekaploidalnego *X. ruvensoriensis*. Udowodniono aktywny udział transpozonów w ewolucji rodzaju *Xenopus*. Co więcej, poliploidyzację *X. laevis* można łatwo zaindukować w warunkach laboratoryjnych. Ciekawe, ile loci *RAG/NWC* pracuje u poliploidów? Czy i w jaki sposób są wyciszane pozostałe?

Session AM, Uno Y, Kwon T, Chapman JA, Toyoda A, Takahashi S, Fukui A, Hikosaka A, Suzuki A, Kondo M, van Heeringen SJ, Quigley I, Heinz S, Ogino H, Ochi H, Hellsten U, Lyons JB, Simakov O, Putnam N, Stites J, Kuroki Y, Tanaka T, Michiue T, Watanabe M, Bogdanovic O, Lister R, Georgiou G, Paranjpe SS, van Kruijsbergen I, Shu S, Carlson J, Kinoshita T, Ohta Y, Mawaribuchi S, Jenkins J, Grimwood J, Schmutz J, Mitros T, Mozaffari SV, Suzuki Y, Haramoto Y, Yamamoto TS, Takagi C, Heald R, Miller K, Haudenschield C, Kitzman J, Nakayama T, Izutsu Y, Robert J, Fortriede J, Burns K, Lotay V, Karimi K, Yasuoka Y, Dichmann DS, Flajnik MF, Houston DW, Shendure J, DuPasquier L, Vize PD, Zorn AM, Ito M, Marcotte EM, Wallingford JB, Ito Y, Asashima M, Ueno N, Matsuda Y, Veenstra GJ, Fujiyama A, Harland RM, Taira M, Rokhsar DS. **Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis***. Nature. 2016 Oct 20;538(7625):336-343. doi: 10.1038/nature19840.

Tandon P, Conlon F, Furlow JD, Horb ME. **Expanding the genetic toolkit in *Xenopus*: Approaches and opportunities for human disease modeling**. Dev Biol. 2017 Jun 15;426(2):325-335. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.04.009.

Du Pasquier L, Wilson M, Sammut B. **The fate of duplicated immunity genes in the dodecaploid *Xenopus ruwenzoriensis***. Front Biosci (Landmark Ed). 2009 Jan 1;14:177-91. Review. PubMed PMID: 19273062.

Z mojego punktu widzenia, minusem tropikalnego rodzaju *Xenopus* jest brak wyraźnej cykliczności sezonowej, która otwiera ogromne pole badawcze u płazów strefy umiarkowanej. Na przykład, u żyjących w Polsce żab zielonych, *Rana temporaria*, grasica w zimie ulega prawie całkowitej atrofii, a odradza się wiosną, i w lecie ma bogatą w limfocyty korę nawet u okazów bardzo starych (np. patrz Plytycz et al. J. Exp. Zool. 273: 451-460, 1995; Miodonski et al. Cell Tissue Res. 281: 543-549, 1995; Plytycz et al. Immunol. Today, 17: 442, 1996). Co jest sygnałem do corocznego, odwracalnego, wyciszania/pobudzania ekspresji genów *RAG/NWC* w grasicy *R. temporaria*?

W moim przekonaniu, dobra praca naukowa to ta, która sprzyja stawianiu kolejnych pytań i poszukiwaniu odpowiedzi. Rozprawa doktorska Pana Łukasza Śnieżewskiego, oraz cykl publikacji, do powstania których się przyczynił, w pełni spełniają to kryterium.

Przedstawiona do zaopiniowania rozprawa „**Charakterystyka aktywności promotora genu *NWC* u wybranych przedstawicieli kręgowców**” spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim, więc zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda o dopuszczenie **Pana mgra inż. Łukasza Śnieżewskiego** do dalszych etapów przewodu doktorskiego. **Z pełnym przekonaniem stawiam też wniosek o wyróżnienie tej rozprawy.**

Barbara Plytycz