

autoreferat
(załącznik 2)

dr Marcin
Ratajewski

1. **Imię i nazwisko: Marcin Marek Ratajewski**
2. **Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej**

doktor nauk biologicznych*dyscyplina: biologia**specjalność: biofizyka*

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź, styczeń 2009

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Charakterystyka promotora genu *ABCC6* związanego z chorobą *pseudoxanthoma elasticum*” (promotor Prof. dr hab. Grzegorz Bartosz; recenzenci: Prof. dr hab. Wanda Krajewska, Prof. dr hab. Jarosław Dziadek).

magister biologii

Wydział Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie:
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska)
Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź, czerwiec
2004

Tytuł pracy magisterskiej: „Identyfikacja, analiza i klonowanie promotora ludzkiego genu *MRP6 (ABCC6)*” (promotor Prof. dr hab. Grzegorz Bartosz).

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych

2004 – obecnie	Asystent a następnie adiunkt w Instytucie Biologii Medycznej PAN, Łódź, Pracownia Regulacji Transkrypcyjnej
2004 – 2008	Słuchacz stacjonarnego Studium Doktoranckiego Biochemiczno-Biofizycznego UŁ przy Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska

4. Wskazanie osiągnięcia naukowego* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 ze zm.).

*W przypadku, gdy osiągnięciem tym jest praca/prace wspólne, należy przedstawić oświadczenia wszystkich jej współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w jej powstawanie (załącznik Z8)

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

„Molekularne mechanizmy regulacji ekspresji genu *RORγT*”

Przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe stanowi monotematyczny cykl czterech oryginalnych publikacji naukowych, znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR). Sumaryczny IF wynosi 17,156 (MNiSW - 135 pkt.). Wymienione prace powstały po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych.

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego.

1. Ratajewski M, Walczak-Drzewiecka A, Salkowska A, Dastych J: Upstream stimulating factors regulate the expression of *RORγT* in human lymphocytes. *J IMMUNOL.* **2012**; 189(6): 3034-42. **IF=5,520; Punkty MNiSW = 40 pkt.** (praca oryginalna)

Mój wkład w powstaniu pracy polegał na: wypracowaniu koncepcji badawczej, nadzorze nad przebiegiem badań opisanych w pracy, opracowaniu i optymalizacji warunków i metod stosowanych w pracy, wykonaniu większości eksperymentalnej części pracy, analizie wyników, przygotowaniu

rycin i udziale w napisaniu manuskryptu. Udział w realizacji pracy oceniam na 80%.

2. **Ratajewski M**, Walczak-Drzewiecka A, Gorzkiewicz M, Sałkowska A, Dastych J: Expression of human gene coding ROR γ T receptor depends on the Sp2 transcription factor. J LEUKOC BIOL. **2016** 100(5): 1213-1223. **IF=4,018; Punkty MNiSW = 35 pkt.** (praca oryginalna)

Mój wkład w powstaniu pracy polegał na: wypracowaniu koncepcji badawczej, nadzorze nad przebiegiem badań opisanych w pracy, opracowaniu i optymalizacji warunków i metod stosowanych w pracy, wykonaniu większości eksperymentalnej części pracy, analizie wyników, przygotowaniu rycin i udziale w napisaniu manuskryptu. Udział w realizacji pracy oceniam na 80%.

3. **Ratajewski M**, Słomka M, Karaś K, Sobalska-Kwapis M, Korycka-Machała M, Sałkowska A, Dziadek J, Strapagiel D, Dastych J: Functional Analysis of the rs774872314, rs116171003, rs200231898 and rs201107751 Polymorphisms in the Human ROR γ T Gene Promoter Region. GENES (BASEL). **2017**; 8(4). pii: E126. **IF=3,600; Punkty MNiSW = 25 pkt.** (praca oryginalna)

Mój wkład w powstaniu pracy polegał na: wypracowaniu koncepcji badawczej, nadzorze nad przebiegiem badań opisanych w pracy, opracowaniu i optymalizacji warunków i metod stosowanych w pracy, konstrukcji wektora reporterowego i mutantów oraz analizie ich aktywności transkrypcyjnej, analizie wyników, przygotowaniu rycin i napisaniu manuskryptu (autor korespondujący). Udział w realizacji pracy oceniam na 65%.

4. Sałkowska A, Karaś K, Walczak-Drzewiecka A, Dastych J, **Ratajewski M**: Differentiation stage-specific effect of histone deacetylase inhibitors on the expression of ROR γ T in human lymphocytes. J LEUKOC BIOL. **2017**; 102(6): 1487-1495. **IF=4,018; Punkty MNiSW = 35 pkt.** (praca oryginalna)

Mój wkład w powstaniu pracy polegał na: wypracowaniu koncepcji badawczej, konstrukcji wektorów reporterowych, całościowej analizie efektów inhibitorów deacetylaz histonów w komórkach Jurkat, analizie danych, przygotowaniu rycin i napisaniu manuskryptu (autor korespondujący). Udział w realizacji pracy oceniam na 55%.

W załączeniu :

- potwierdzenie IF z poświadczeniem przez Bibliotekę Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (załącznik nr 6)
- kopie powyższych prac (załącznik nr 7)
- oświadczenie współautorów o indywidualnym wkładzie autorskim (załącznik nr 8)

c) Omówienie osiągnięć naukowych przedłożonych do oceny (z podaniem, dla każdego etapu przedstawianej pracy celu, osiągnięć i możliwych zastosowań)

W przeszłości uważano, że komórki T pomocnicze (Th) stanowią pojedynczą grupę limfocytów T. Obecnie wyróżnia się aż dziewięć subpopulacji: Th1, Th2, Th17, Treg, Th9, Th22 oraz Tfh, przy czym jedynie pierwsze cztery są względnie dobrze scharakteryzowane pod względem czynników transkrypcyjnych, które zawiadują ich różnicowaniem oraz cytokin, które te komórki wydzielają. Różnicowanie komórek Th1 opiera się na czynniku t-bet a ich rolą jest eliminacja wewnątrzkomórkowych patogenów: komórki te wydzielają IFN- γ , który aktywuje makrofagi. Różnicowanie komórek Th2 zależne jest od czynnika GATA3. Rolą tych limfocytów jest rozpoznawanie antygenów w tym alergenów i wzbudzanie odpowiedzi skierowanej przeciwko zewnątrzkomórkowym patogenom, w tym pasożytom, poprzez produkcję IL-4, IL-5 oraz IL-13. Różnicowaniem komórek T regulatorowych (Treg) kieruje czynnik FOXP3, a komórki te pełnią rolę supresorową. Dzieje się tak za sprawą wydzielania cytokin IL-10 oraz TGF- β oraz oddziaływań z białkami TIGIT i CTLA-4. Limfocyty Treg uczestniczą w utrzymywaniu tolerancji immunologicznej, hamują autoagresję oraz odpowiedź przeciwko nowotworom.

Limfocyty Th17 odgrywają kluczową rolę w obronie gospodarza przeciwko takim drobnoustrojom jak: *Bacillus anthracis*, *Staphylococcus aureus* i *Candida albicans*. Niestety, przez udział w niszczeniu tkanek w chorobach autoimmunologicznych (reumatoidalne zapalenie stawów, stwardnienie rozsiane, łuszczyca, choroba Gravesa-Basedowa, nieswoiste zapalenie jelit) limfocyty Th17 postrzegane są jako komórki w dużej mierze szkodliwe. ROR γ T jest sygnaturowym czynnikiem transkrypcyjnym dla limfocytów Th17, niezbędnym do podtrzymania różnicowania naiwnych komórek CD4⁺ w kierunku Th17 i regulującym ekspresję charakterystycznych dla tej grupy komórek cytokin prozapalnych – interleukiny 17A (IL17A) oraz interleukiny 17F (IL17F). Modulacja funkcji limfocytów Th17 poprzez wpływanie na aktywność czynnika transkrypcyjnego ROR γ T oraz/lub jego ekspresję, tym samym procesów, w których te komórki uczestniczą, jest obiektem zainteresowania badaczy zajmujących się biologią limfocytów Th17 oraz rozwojem nowych metod leczenia chorób autoimmunologicznych poprzez efektywną immunomodulację hamującą patogenną odpowiedź odpornościową.

Białko ROR γ T jest produktem genu *RORC*. W obrębie genu *RORC* istnieją dwa alternatywne promotory, których użycie przez maszynę transkrypcyjną, prowadzi do powstania dwóch transkryptów i w efekcie ekspresji dwóch białkowych izoform (będących czynnikami transkrypcyjnymi): ROR γ i ROR γ T. ROR γ jest o 21 aminokwasów dłuższym białkiem od ROR γ T, a różnice w sekwencji aminokwasowej dotyczą końca N-terminalnego. Obydwie izoformy różni także dystrybucja tkankowa: ROR γ podlega ekspresji w większości tkanek m.in. w wątrobie, mięśniach i nerkach, gdzie reguluje ekspresję genów związanych z metabolizmem i cyklem okołodobowym, podczas gdy ekspresja ROR γ T ograniczona jest tylko do pewnych subpopulacji limfocytów CD4 pozytywnych, głównie limfocytów Th17.

Głównym celem przedstawionego do oceny cyklu publikacji była identyfikacja i charakterystyka wybranych mechanizmów regulujących proces

ekspresji ludzkiego genu *ROR γ T* i ich udziału w procesie różnicowania komórek Th17.

W pierwszej pracy, przedstawionej do oceny, zidentyfikowano sekwencję promotorową ludzkiego genu *ROR γ T*. W pracy zastosowano szereg wektorów reporterowych zawierających mutanty delecyjne, a także określono ważne dla aktywności promotora, miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych. Analiza ekspresji mRNA w liniach komórkowych o różnym pochodzeniu tkankowym wykazała, że *ROR γ* i *ROR γ T* nie występują w komórkach człowieka razem. Dotyczy to także pierwotnych limfocytów Th17, co jest wyraźną różnicą w stosunku do limfocytów Th17 myszy, w których zarówno *Rory* i *RoryT* podlegają ekspresji na podobnym poziomie. Przy zastosowaniu techniki genów reporterowych wykazano, że w regionach -180/+78 oraz -341/-180 (licząc od miejsca inicjacji translacji) znajdują się sekwencje odpowiadające za tkankowo-swoistą (specyficzną dla komórek limfocytów) aktywność promotora genu *ROR γ T*. Skrining z zastosowaniem wektorów ekspresyjnych dla czynników transkrypcyjnych aktywujących promotor pozwolił zidentyfikować białka USF-1 i USF-2 jako potencjalne aktywatory badanego promotora. Analiza bioinformatyczna sekwencji promotorowej programem MatInspector wykazała obecność czterech miejsc typu E-BOX (CANNTG) rozpoznawanych przez czynniki transkrypcyjne z rodziny USF. Co więcej, porównanie sekwencji promotorowych genu *ROR γ T* człowieka, szympansa, bydła domowego i myszy, z zastosowaniem programu ClustalW, wykazało wysoki stopień zachowania ewolucyjnego zwłaszcza miejsc E-BOX1 i E-BOX2. Wprowadzenie mutacji, które niszczyły poszczególne miejsca E-BOX potwierdziło, że E-BOX4 i E-BOX3 mają raczej niewielki wpływ na aktywność bazalną badanego promotora oraz jego indukowalność przez białka USF-1 i USF-2. Mutageneza najbardziej ewolucyjnie zachowanych miejsc E-BOX2 i E-BOX1 znacząco obniżała zdolność promotora do odpowiedzi na nadekspresję czynników USF-1 i USF-2 i całkowicie znosiło tę odpowiedź w przypadku jednoczesnego wprowadzenia mutacji do obu miejsc. Dodatkowo okazało się, że E-BOX2 jest elementem niezbędnym do zachowania aktywności wzmacniającej sekwencji -341/-180, gdyż zmutowanie tego miejsca zmniejszało aktywność sekwencji -341/+78 do poziomu obserwowalnego dla fragmentu -180/+78. Pomiar zmiany ruchliwości elektroforetycznej (EMSA) wykazał, że wszystkie cztery sekwencje E-BOX zdolne są do wiązania zarówno białka USF-1 jak i USF-2. Wyniki te zostały również potwierdzone w żywych komórkach przy zastosowaniu techniki immunoprecypitacji chromatyny (ChIP). Zahamowanie ekspresji czynników USF-1 i USF-2 przy użyciu specyficznych siRNA potwierdziło aktywatorową funkcję tych białek w regulacji ekspresji ludzkiego genu *ROR γ T* zarówno w linii komórkowej Jurkat jak i różnicowanych *in vitro*, pierwotnych komórkach Th17. Nie udało się zaobserwować zahamowania ekspresji interleukiny 17A oraz jej wydzielania. Może być to efektem niedostatecznej inhibicji czynników USF (a co za tym idzie także *ROR γ T*) wynikającej z niskiej wydajności nukleofekcji komórek pierwotnych lub udziału innych czynników transkrypcyjnych (niż *ROR γ T*) w regulację ekspresji *IL17A*, np. czynnika NFAT. **Przeprowadzone badania wykazały**

po raz pierwszy istnienie powiązania między czynnikami USF, regulującymi ekspresję wielu genów zaangażowanych w utrzymywanie homeostazy glukozy i lipidów, a ROR γ T, co z kolei sugeruje potencjalny związek chorób metabolicznych i stanu zapalnego wywoływanego przez komórki Th17.

Kolejnym celem badawczym w przedstawianym cyklu publikacji było określenie które elementy w sekwencji -180/+78 (zawierającej miejsca inicjacji transkrypcji) promotora genu *ROR γ T* są niezbędne dla zachowania jego aktywności podstawowej. **Odpowiedź na to pytanie zawarto w przedstawionej do oceny pracy nr 2, w której zidentyfikowano specyficzne dla naczelnych miejsca wiązania dla czynników transkrypcyjnych z rodziny Sp.**

Analiza *in silico* proksymalnego fragmentu genu *ROR γ T* wykazała istnienie dwóch elementów typu GC-BOX w regionach -90/-76 (GC-BOX1) oraz +30/+37 (GC-BOX2) zdolnych do wiązania czynników z rodziny Sp. Porównanie proksymalnych fragmentów promotora *ROR γ T* człowieka, szympansa, goryla, orangutana, bydlę domowego, oraz myszy wykazało, że obie sekwencje typu GC-BOX zachowane są tylko u naczelnych. Do sprawdzenia funkcjonalności zidentyfikowanych miejsc, użyto mitramycyny A, antybiotyku wyizolowanego ze *Streptomyces plicatus*, wiążącego się do DNA w obszarach bogatych w pary GC i hamującego interakcje czynników Sp z DNA. Mitramycyna A w sposób istotny hamowała aktywność badanego promotora, a zastosowanie mutantów delecyjnych wskazało, że elementy odpowiedzi na antybiotyk znajdują się we fragmencie -180/+78, co było zgodne z wynikami uzyskanymi metodami bioinformatycznymi. Test zmiany ruchliwości elektroforetycznej (EMSA) potwierdził, że w warunkach *in vitro* sekwencja DNA zawierająca GC-BOX1 specyficznie wiąże białko Sp2, podczas gdy sekwencja zawierająca GC-BOX2 wiąże zarówno białka Sp2 jak i Sp1. Wiązania innych białek z tej rodziny (Sp3 i Sp4) nie stwierdzono. Wiązanie się czynników z rodziny Sp do promotora genu *ROR γ T* w żywych komórkach zostało potwierdzone przy zastosowaniu techniki immunoprecypitacji chromatyny. Największą liczbę kopii promotora *ROR γ T* zaobserwowano w próbach immunoprecypitowanych przeciwciałami skierowanymi przeciwko Sp2 oraz Sp1 zarówno w komórkach linii Jurkat jak i pierwotnych komórkach Th17. Obecność mitramycyny A zaś ten efekt wyraźnie obniżała. Mutageneza kierowana miejsc GC-BOX1 lub GC-BOX2 hamowała aktywność promotora, wskazując że: a) każde z nich jest kluczowe dla zachowania jego funkcji; b) prawdopodobnie, białka związane z tymi miejscami wzajemnie ze sobą oddziałują. Zahamowanie ekspresji Sp2 (poprzez użycie specyficznego siRNA) w komórkach linii Jurkat i pierwotnych komórkach Th17 skutkowało obniżeniem ekspresji *ROR γ T* oraz *ROR γ T*-zależnych genów: *IL17A* i *IL17F*, oraz wydzielaniem *IL17A/F*. Co ciekawe, choć mitramycyna A była bardzo skuteczna w inhibicji ekspresji *ROR γ T*, nie wpływała na ekspresję *IL17A* i *IL17F*. Prawdopodobnie wynika to z faktu, że w przeciwieństwie do siRNA, mitramycyna A nie jest specyficznym inhibitorem, a jej plejotropowe działania mogą mieć trudny do przewidzenia efekt. Tym niemniej, nie można wykluczyć, że wynalezienie nowych bardziej specyficznych inhibitorów białek Sp1/Sp2 mogłoby znaleźć zastosowanie

w leczeniu chorób autoimmunologicznych. **W podsumowaniu, w pracy nr 2 jednoznacznie wykazano, że miejsca GC-BOX1 i GC-BOX2 w proksymalnym promotorze genu *RORγT* są niezbędne do zachowania aktywności tego promotora, a białko Sp2 wiążące się do tych miejsc jest kluczowym regulatorem ekspresji *RORγT* w ludzkich limfocytach.**

Niektóre polimorfizmy w regionach regulatorowych genów związane są z występowaniem stanów patologicznych lub ich nasileniem. Zdarza się także, że polimorfizmy chronią przed wystąpieniem choroby. Dlatego racjonalnym rozwinięciem badań nad promotorem ludzkiego genu *RORγT* było poszukiwanie w jego sekwencji polimorfizmów, które mogłyby wpływać na jego aktywność. Interesujące dane na ten temat przedstawiono **w pracy nr 3**. Analiza baz danych zawierających warianty genetyczne (NCBI Variation Resources) wykazała istnienie czterech polimorfizmów w miejscu GC-BOX2: rs774872314 G>A, rs116171003 G>T, rs200231898 C>T oraz rs201107751 G>A. Wprowadzenie tych polimorfizmów do miejsca GC-BOX2 doprowadziło do spadku aktywności transkrypcyjnej promotora następująco: dla rs774872314 o 41%, dla rs116171003 o 48%, dla rs200231898 o 20%, a dla rs201107751 do niemal całkowitego zahamowania funkcji promotorowej. Kolejnych danych dostarczyło zbadanie jak poszczególne polimorfizmy wpływają na wiązanie białek Sp1 i Sp2 do znakowanej sondy w teście ruchliwości elektroforetycznej (EMSA). Wprowadzenie polimorfizmów mających największy negatywny wpływ na aktywność promotora genu *RORγT*: rs774872314, rs116171003, oraz rs201107751 skutkowało mniejszym wiązaniem białka Sp2 i całkowitym brakiem wiązania białka Sp1, zaś polimorfizm rs200231898 wpływał tylko na wiązanie Sp2. Przy zastosowaniu dodatkowych technik doświadczalnych: analizy krzywej topnienia w wysokiej rozdzielczości (HRM) i sekwencjonowania, sprawdzono jak zidentyfikowane polimorfizmy rozkładają się w populacji polskiej. W badanej próbie 5130 osób zidentyfikowano występowanie polimorfizmu rs116171003 o częstości 3.42% i rozkładzie genotypów: GG=96.575%, GT=3.385%, TT=0.040%. **Wyniki uzyskane w pracy nr 3 potwierdzają kluczową rolę sekwencji GC-BOX2 dla zachowania aktywności promotora genu *RORγT*. Wskazują także ważną rolę białka Sp1 (być może jako białka dokującego) dla aktywności transaktywacyjnej badanego promotora, czego nie udało się potwierdzić we wcześniejszej pracy. Ponadto w pracy tej wykazano, że polimorfizmy w miejscu GC-BOX2 mogą potencjalnie negatywnie wpływać na ekspresję genu *RORγT*, co może się przekładać na osłabienie odpowiedzi odpornościowej (polimorfizm rs201107751) lub na mniejszą podatność na choroby autoimmunologiczne (polimorfizmy rs774872314, rs116171003, rs200231898).**

Wiele badań z wykorzystaniem modelu mysiego wskazywało na potencjalny udział deacetylaz histonów w regulację ekspresji i funkcji *Roryt*. Zastosowanie inhibitorów deacetylaz histonów przez różne grupy badawcze prowadziło do wyników sprzecznych zarówno pod kątem ekspresji *Roryt* jak i wpływu tych związków na komórki Th17. Wskazywało to na potrzebę sprawdzenia jak inhibicja deacetylaz

histonów wpływa na ekspresję *ROR γ T* i komórki Th17 człowieka. Nowe dane na ten temat oraz propozycję wyjaśnienia obecnych w literaturze przedmiotu sprzecznych wyników przedstawiono w **pracy nr 4**. Badania przeprowadzono na 3 modelach badawczych: pierwotnych komórkach CD4⁺ różnicujących w kierunku limfocytów Th17, w pełni zróżnicowanych komórkach Th17 oraz linii Jurkat (komórki ostrej białaczki z komórek T) z wykorzystaniem dwóch inhibitorów deacetylazy histonów: apicydyny i maślanu sodu. W naiwnych komórkach CD4⁺ różnicujących w kierunku limfocytów Th17 w obecności inhibitorów deacetylaz histonów stwierdzono zahamowanie ekspresji *ROR γ T* oraz *IL17A*, *IL17F*, *IL9*, *IL21*, *IL6* oraz wydzielania *IL17A/F*. Dodatkowo w komórkach poddanych działaniu apicydyny zahamowaniu ulegał receptor dla *IL6* (*IL6R*). Niespodziewanie, w komórkach tych przy użyciu techniki immunoprecypitacji chromatyny wykazano wzrost stężenia acetylowanego histonu H4 związanego z promotorem genu *ROR γ T*. Gdy w pełni zróżnicowane komórki Th17 poddano działaniu obu inhibitorów, obserwowano wzrost ekspresji *ROR γ T* oraz *IL17A*, *IL17F* a także wydzielana *IL17A/F*, co skorelowane było ze wzrostem stężenia acetylowanej formy histonu H4 (acetylacja na lizynie 16 – H4K16) na promotorze genu *ROR γ T*. W przypadku komórek linii Jurkat, apicydyna i maślan sodu również prowadziły do indukcji ekspresji *ROR γ T*, co także było związane ze zwiększeniem wiązania acetylowanych form histonu H4 (H4K8 dla maślanu sodu i H4K16 dla apicydyny). Co więcej, oba inhibitory deacetylaz histonów indukowały również aktywność promotora genu *ROR γ T*, a miejscem docelowym ich działania były sekwencje wcześniej zidentyfikowane jako kluczowe dla zachowania pełnej aktywności transkrypcyjnej tego promotora. **Wyniki zamieszczone w pracy nr 4 wskazują, że efekt inhibitorów deacetylazy histonów na ekspresję *ROR γ T* oraz *ROR γ T*-zależnych genów zależy od stopnia zróżnicowania komórek Th17. Te obserwacje należy uwzględnić rozważając plany zastosowania inhibitorów deacetylaz histonów w leczeniu chorób autoimmunologicznych lub chorób nowotworowych, w których komórki Th17 odgrywają nie w pełni poznaną funkcję.**

Za najważniejsze osiągnięcia w przedstawionym cyklu publikacji uważam:

- pierwszą charakterystykę promotora genu *ROR γ T* człowieka
- wykazanie, że sekwencja wzmacniająca zidentyfikowana w regionie -341/-180 promotora *ROR γ T* zależna jest od miejsca typu E-BOX
- wskazanie mechanizmu molekularnego potencjalnego związku między chorobami metabolicznymi, a stanem zapalnym spowodowanym przez limfocyty Th17
- odkrycie, że kluczowymi dla zachowania aktywności promotora genu *ROR γ T* w limfocytach człowieka są dwa, specyficzne dla naczelnych, miejsca typu GC-BOX do których wiążą się białka Sp1 i Sp2
- wykazanie, że regulacja genu *ROR γ T* u człowieka i myszy jest najprawdopodobniej różna

- wykazanie, że polimorfizmy w regionie regulatorowym genu *RORγT* wpływają na aktywność promotora i mogą mieć potencjalne znaczenie kliniczne
- wykazanie, że efekty zastosowania inhibitorów deacetylazy histonów zależą od stopnia zróżnicowania limfocytów Th17

Choroby autoimmunologiczne są poważnym problemem medycznym. Dane epidemiologiczne wskazują, że najbardziej powszechne choroby z tej grupy, takie jak reumatoidalne zapalenie stawów, dotykają w krajach europejskich nawet do 10% całej populacji. Duża liczba chorób z tej kategorii ma charakter przewlekłych, nieuleczalnych schorzeń, które wymagają od chorego przyjmowania leków do końca życia. Stosowane w terapii tych chorób leki immunosupresyjne mają wiele skutków ubocznych. Żeby zmniejszyć lub wyeliminować ich zastosowanie, potrzebne jest znalezienie nowych tarcz terapeutycznych. *RORγT*, czynnik transkrypcyjny niezbędny do różnicowania komórek Th17, mających szczególne znaczenie w patogenezie chorób z autoagresji, wydaje się być taką tarczą. Poznanie mechanizmów jego regulacji, może przyczynić się do rozwoju terapii celowanych, mogących zwiększać możliwości modulacji funkcji określonych komórek układu immunologicznego.

d) Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

1. Badanie mechanizmów oporności wielolekowej czerniaków

Oporność lekowa (ang. *drug resistance*) jest zjawiskiem nabycia przez komórki nowotworowe oporności na chemioterapeutyki. Jest ona przyczyną nieskuteczności wielu rodzajów chemioterapii. Czerniak złośliwy jest samoistnie odporny na wiele rodzajów terapii m.in. radioterapię czy konwencjonalną chemioterapię, a mechanizmy nabywania oporności przez komórki czerniaka są nieznane, choć podejrzewa się, że nadekspresja białek antyapoptotycznych (np. BCL-2), transporterów z rodziny ABC (np. ABCB5), onkogenów (np. BRAF, MITF) oraz oddziaływania międzykomórkowe w mikrośrodowisku guza mogą mieć znaczenie. Czynnik transkrypcyjny Sp1 znany jest głównie z regulacji ekspresji konstytutywnych genów metabolizmu podstawowego, tym niemniej jego liczne modyfikacje posttranslacyjne i oddziaływania z innymi białkami i udział w regulacji genów zaangażowanych w nowotworzenie czynią go potencjalnym celem terapii przeciwnowotworowych. Zastosowanie mitramycyny A w komórkach czerniaka, hamowało ekspresję panelu białek oporności wielolekowej związanych z czerniakiem: ABCB8, ABCB10, ABCC1 oraz ABCC2 oraz uwrażliwiało te komórki na działanie doksorubicyny [Sachrajda i Ratajewski, 2011]. Skrining biblioteki chemicznej przeprowadzony w celu znalezienia substancji czynnych wobec komórek czerniaka, doprowadził do identyfikacji związku AC-93253, inhibitora sirtuiny 2, który hamował proliferację komórek czerniaka, ich

zdolność do migracji oraz zmieniał rozkład faz cyklu komórkowego i uwrażliwiał komórki na działanie doksorubicyny. Było to skorelowane z zahamowaniem ekspresji genów kodujących białka oporności wielolekowej (m.in. *ABCB5*, *ABCB8*, *ABCC1*), onkogenów (np. *MITF*, *NRAS*), regulatorów cyklu komórkowego (np. *MKI67*, *CCNA2*, *CCNE1*, *CCNE2*, *CDK2*) i związanych z apoptozą (np. *BCL2*, *BIRC5*) [Karwaciak i in. 2015].

Publikacje habilitanta dotyczące tej tematyki

- Sachrajda I, **Ratajewski M**: Mithramycin A suppresses expression of the human melanoma-associated gene *ABCB8*. *MOL GENET GENOMICS*. **2011**; 285(1): 57-65.
- Karwaciak I, Gorzkiewicz M, Ryba K, Dastych J, Pulaski L, **Ratajewski M**: AC-93253 triggers the downregulation of melanoma progression markers and the inhibition of melanoma cell proliferation. *CHEM BIOL INTERACT*. **2015**; 236: 9-18.

2. Badanie mechanizmów regulacji transkrypcji genu *HIF1A*

HIF1A koduje białko HIF1 alfa, które uważane jest za główny czynnik transkrypcyjny regulujący fizjologię komórki w odpowiedzi na hipoksję. W literaturze naukowej istniało przekonanie, że *HIF1A* jest genem konstytutywnym, którego ekspresja we wszystkich komórkach jest na podobnym poziomie, a regulacja odbywa się poprzez dobrze poznane mechanizmy. Okazało się jednak, że w komórkach tucznych transkrypcję *HIF1A* można pobudzić poprzez szlak kalcyneuryny. Kalcyneuryna aktywuje czynnik transkrypcyjny NFAT, który wiąże się do miejsca w promotorze genu *HIF1A* i zwiększa jego ilość na poziomie mRNA i białka [Walczak-Drzewiecka i in. 2008]. Analiza ekspresji *HIF1A* w różnych liniach komórkowych oraz różnych komórkach (np. komórki CD34+ izolowane ze szpiku lub krwi obwodowej) wykazała istnienie różnic w poziomie jego ekspresji. Stwierdzono, że niski poziom ekspresji *HIF1A* w niektórych komórkach skorelowany jest z hipermetylacją wyspy CpG w sekwencji 5'-flankującej gen *HIF1A* [Walczak-Drzewiecka i wsp. 2010]. Podczas dalszych prac nad tym zagadnieniem zaobserwowano, że różnicowanie pierwotnych komórek CD133+ w kierunku dojrzałych komórek tucznych wiąże się ze wzrostem ekspresji *HIF1A* (stopniowy spadek poziomu metylacji wyspy CpG) oraz spadkiem ekspresji *CD34* (wzrost poziomu metylacji cytozyn w promotorze genu) [Walczak-Drzewiecka i in. 2013].

Publikacje habilitanta dotyczące tej tematyki

Przed doktoratem:

- Walczak-Drzewiecka A, **Ratajewski M**, Wagner W, Dastych J: HIF-1alpha is up-regulated in activated mast cells by a process that involves calcineurin and NFAT. *J IMMUNOL*. **2008**; 181(3): 1665-72.

Po doktoracie:

- Walczak-Drzewiecka A, Ratajewski M, Pułaski Ł, Dastych J: DNA methylation-dependent suppression of HIF1A in an immature hematopoietic cell line HMC-1. *BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN*. **2010**; 391(1): 1028-32.
- Walczak-Drzewiecka A, Salkowska A, Ratajewski M, Dastych J: Epigenetic regulation of CD34 and HIF1A expression during the differentiation of human mast cells. *IMMUNOGENETICS*. **2013**; 65(6): 429-38.

3. Poszukiwanie nowych substancji aktywujących receptor jądrowy PXR

Receptory jądrowe to rodzina czynników transkrypcyjnych, które mają podobną, domenową strukturę i działają jako czynniki transkrypcyjne indukowane ligandem. Małe, hydrofobowe cząsteczki wiążące się do domeny wiążącej ligand (LBD) receptora, zmieniające jego aktywność transkrypcyjną, nazywają się ligandami. Wiele receptorów jądrowych funkcjonuje jako sensory ksenobiotyków zdolnych do regulacji ich (własnego) metabolizmu i położenia (poprzez regulację ekspresji genów kodujących enzymy i białka transporterowe). Ksenobiotyki oddziałując z receptorami jądrowymi często zaburzają funkcjonowanie układu hormonalnego, powodują zmiany w metabolizmie leków, prowadzące do wystąpienia efektów niepożądanych. Jednym z receptorów jądrowych biorących udział w biotransformacji ksenobiotyków jest PXR (*pregnane X receptor*), który po utworzeniu heterodimeru z innym receptorem jądrowym RXR (*retinoic acid X receptor*) reguluje ekspresję szeregu enzymów fazy I (m.in. CYP2B6, CYP2C9, CYP3A4, CYP3A7), fazy II (m.in. UGT, GST i SULT) oraz transporterów (np. ABCB1, OATP2). Do poszukiwań potencjalnych ligandów receptora PXR wykorzystano skonstruowaną linię reporterową – stabilnie transfekowaną wektorem reporterowym (zawierającym elementy odpowiedzi dla czynnika PXR) linię komórek HepG2 (komórki raka wątrobowokomórkowego). W skryningu biblioteki mykotoksyn wyłowiono aflatoksyny (B1, M1 i G1) jako potencjalne aktywatory PXR-zależnej transkrypcji. Aflatoksyny były zdolne do indukcji ekspresji genu *CYP3A4* (który odpowiada m.in. za biotransformację aflatoksyn) oraz zwiększenia związanej z jego promotorem białka PXR. Analiza ekspresji mikromacierzowej wykazała dodatkowo, że aflatoksyna B1 wpływa na ekspresję genów fazy I i II, a także tych zaangażowanych w metabolizm cholesterolu [Ratajewski i in. 2011]. Skryning biblioteki 1120 substancji oraz 3-stopniowa walidacja uzyskanych wyników doprowadziły do identyfikacji 19 substancji zdolnych do PXR-zależnej indukcji transkrypcji. Współczynnik korelacji między eksperymentalnie zmierzoną transaktywacją PXR a strukturalnymi deskryptorami zidentyfikowanych związków uzyskał wysokie wartości. Grupowanie za pomocą wielowymiarowego skalowania wykazało, że związki, które przeszły 3-stopniową walidację, nie grupują się w jednym klastrze, ale należą do kilku, strukturalnie różnych grup. Co ciekawe, część z nich lokowała się w pobliżu dobrze poznanego ligandu PXR, rifampicyny.

Wyniki uzyskane w pracy wyjaśniają mechanistycznie także obserwowalne kliniczne interakcje między newarapiną a mykofenolanem mofetylu. Jak udowodniono, kwas mykofenolowy zależnie od PXR, indukuje ekspresję CYP3A4 uczestniczącego w metabolizmie newarapiny. Zwiększona ilość aktywnego enzymu, skutkuje zmniejszonym stężeniem leku w surowicy [Ratajewski i in. 2015]. Wytworzona linia komórkowa okazała się być również przydatna do monitorowania atypowej, niezależnej od mikrocystyny, toksyczności ekstraktów z sinic. Indukcja PXR-zależnej transkrypcji przez (niezidentyfikowane) związki znajdujące się w sinicach, może wyjaśniać toksyczne efekty jakie sinice wywołują w komórkach wątroby pośrednio (przez metabolity) lub bezpośrednio [Mankiewicz-Boczek i in. 2015].

Publikacje habilitanta dotyczące tej tematyki

- **Ratajewski M**, Walczak-Drzewiecka A, Sałkowska A, Dastych J: Aflatoxins upregulate CYP3A4 mRNA expression in a process that involves the PXR transcription factor. *TOXICOLOGY LETT.* **2011**; 205(2): 146-53.
- **Ratajewski M**, Grzelak I, Wiśniewska K, Ryba K, Gorzkiewicz M, Walczak-Drzewiecka A, Hoffmann M, Dastych J: Screening of a chemical library reveals novel PXR-activating pharmacologic compounds. *TOXICOLOGY LETT.* **2015**; 232(1): 193-202.
- Mankiewicz-Boczek J, Karwaciak I, **Ratajewski M**, Gaęta I, Jurczak T, Zalewski M, Pułaski Ł: Application of cellular biosensors for detection of atypical toxic bioactivity in microcystin-containing cyanobacterial extracts. *AQUAT TOXICOL.* **2015**;168: 1-10.

4. Transkrypcyjne mechanizmy regulacji ekspresji genu *ABCC6*

Pseudoxanthoma elasticum (PXE) jest chorobą tkanki łącznej polegającą na mineralizacji i pękaniu włókien elastynowych. Manifestacje choroby dotyczą skóry, oka (błony Brucha) oraz naczyń krwionośnych. U chorych na PXE występują mutacje w genie kodującym transporter *ABCC6* (o nieznannej funkcji i nieznanym substracie), który wykazuje wybitnie wątrobowo-specyficzną ekspresję. PXE uważana jest za chorobę metaboliczną, spowodowaną brakiem niezidentyfikowanej substancji transportowanej z wątroby do krwi. W przeszłości poznanie mechanizmów regulacji ekspresji przyczyniło się do poznania funkcji niektórych transporterów z rodziny ABC, dlatego też, podjęto się szczegółowej analizy mechanizmów jakim gen *ABCC6* podlega regulacji w komórkach wątroby. Badanie aktywności promotora genu *ABCC6* wykazało istnienie aktywatorowej, wątrobowo-swoistej sekwencji w obszarze -332/-145. W regionie tym zidentyfikowano także potencjalną wyspę CpG. Analiza metylacji *in vivo* wykazała, że w komórkach, w których gen *ABCC6* nie podlega ekspresji, wyspa ta jest metylowana, podczas gdy w komórkach w których *ABCC6*

podlega ekspresji, nie obserwowano metylowanych cytozyn w jej obrębie [Aranyi i in. 2005]. Użycie znanych agonistów receptorów jądrowych doprowadziło do znalezienia receptora RXR jako czynnika indukującego ekspresję genu *ABCC6* przez retinoidy [Ratajewski i in. 2006]. Skrining biblioteki czynników transkrypcyjnych wykazał, że czynniki z rodziny PLAG (*PLAG1* i *PLAGL1*) są zdolne do indukcji badanego promotora. Analiza delecyjna wykazała, że miejsca ich odpowiedzi znajdują się w pozycjach -223/-208 oraz -167/-145, a więc w obszarze sekwencji odpowiedzialnej za tkankowo-swoistą ekspresję genu. Dalsze badania wskazały, że czynniki PLAG są raczej pośrednio, a nie bezpośrednio zaangażowane w wątrobowo-swoistą ekspresję *ABCC6* prawdopodobnie poprzez bezpośrednie oddziaływanie z innym czynnikiem transkrypcyjnym [Ratajewski i in. 2008]. Jedyny polimorfizm (-219A>C) w regionie regulatorowym genu *ABCC6* występujący częściej u chorych na *pseudoxanthoma elasticum* zlokalizowany jest w jednym z wcześniej zidentyfikowanym miejscu PLAG. Wprowadzenie tego polimorfizmu do promotora nie zmieniało jego odpowiedzi na nadekspresję czynników PLAG, ale wprowadzenie analogicznej mutacji w obszarze drugiego miejsca PLAG, nie tylko zmniejszało odpowiedź na czynniki PLAG, ale całkowicie hamowało wątrobowo-swoistą aktywność regionu -332/-145 promotora genu *ABCC6* [Ratajewski i in. 2009]. Dalsze badania pozwoliły zidentyfikować czynnik HNF4 α jako główny regulator wątrobowo-specyficznej ekspresji genu *ABCC6*. Aktywacja szlaku ERK1/2 prowadzi do zahamowania wiązania tego czynnika transkrypcyjnego do promotora i w konsekwencji do zahamowania ekspresji *ABCC6* [de Boussac i in. 2010]. Użycie testu nadwrażliwości na DNazę I pozwoliło odnaleźć dodatkowy region regulatorowy w pierwszym intronie genu *ABCC6* o charakterze sekwencji wzmacniającej, zależnej od czynnika – C/EBP β , który nie tylko uczestniczy w tkankowo-swoistej ekspresji genu, ale może pełnić funkcję metabolicznego sensora [Ratajewski i in. 2012].

Publikacje habilitanta dotyczące tej tematyki

Przed doktoratem:

- Arányi T, **Ratajewski M**, Bardóczy V, Pulaski L, Bors A, Tordai A, Váradi A: Identification of a DNA methylation-dependent activator sequence in the pseudoxanthoma elasticum gene, *ABCC6*. *J BIOL CHEM.* **2005**; 280(19): 18643-50.
- **Ratajewski M**, Bartosz G, Pulaski L: Expression of the human *ABCC6* gene is induced by retinoids through the retinoid X receptor. *BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN.* **2006**; 350(4):1082-7.
- **Ratajewski M**, Van de Ven WJ, Bartosz G, Pulaski L: The human pseudoxanthoma elasticum gene *ABCC6* is transcriptionally regulated by PLAG family transcription factors. *HUM GENET.* **2008**; 124(5): 451-63.

Po doktoracie:

- **Ratajewski M**, de Boussac H, Pulaski L: Liver-specific enhancer in ABCC6 promoter-Functional evidence from natural polymorphisms. *BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN.* **2009**; 383(1): 73-7.
- de Boussac H, **Ratajewski M**, Sachrajda I, Köblös G, Tordai A, Pulaski L, Buday L, Váradi A, Arányi T: The ERK1/2-hepatocyte nuclear factor 4alpha axis regulates human ABCC6 gene expression in hepatocytes. *J BIOL CHEM.* **2010**; 285(30): 22800-8.
- **Ratajewski M**, de Boussac H, Sachrajda I, Bacquet C, Kovács T, Váradi A, Pulaski L, Arányi T: ABCC6 expression is regulated by CCAAT/enhancer-binding protein activating a primate-specific sequence located in the first intron of the gene. *J INVEST DERMATOL.* **2012**; 132(12): 2709-17.

5. Klonowanie i charakterystyka promotorów genów kodujących białka mitochondrialne.

Regulacja ekspresji genów kodujący białka mitochondrialne ma głównie charakter regulacji transkrypcyjnej. W promotorach takich genów często można odnaleźć zwiększoną liczbę charakterystycznych elementów odpowiedzi dla czynników związanych z regulacją funkcji mitochondriów. Nieprawidłowa praca mitochondriów związana jest z wieloma chorobami, a określenie mechanizmów, które tą pracą kierują, może dostarczyć nowych tarcz terapeutycznych. Gen *GDAP1* koduje białko lokujące się w zewnętrznej błonie mitochondrialnej. Mutacje w tym genie prowadzą do wystąpienia dziedzicznych neuropatii ruchowo-czuciowych (choroba Charcota-Mariego-Tootha typ CMT2H oraz CMT4A). Przeprowadzone eksperymenty po raz pierwszy pokazały, że ekspresja *GDAP1* nie jest ograniczona do komórek układu nerwowego. Regulacją ekspresji tego genu kieruje m.in. czynnik YY1, pełniący ważne funkcje w regulacji znanych genów mitochondrialnych a także w rozwoju całego układu nerwowego [Ratajewski i Pułaski, 2009].

ABCB10 jest transporterem z rodziny ABC, którego białkowy produkt lokuje się w wewnętrznej błonie mitochondriów. Choć jego funkcja *bona fide* jest nieznana, jest on niezbędny do procesu hemoglobinizacji i erytropoezy. W promotorze genu *ABCB10* zidentyfikowano kilka miejsc wiązania dla czynników z rodziny E2F. Szczegółowa analiza pozwoliła na wskazanie roli czynnika E2F4 w pozytywnej regulację tego genu [Karwaciak i in. 2014].

Publikacje habilitanta dotyczące tej tematyki

- **Ratajewski M**, Pulaski L: YY1-dependent transcriptional regulation of the human *GDAP1* gene. *GENOMICS* **2009**; 94(6): 407-13.

- Karwaciak I, Pulaski L, **Ratajewski M**: Regulation of the human ABCB10 gene by E2F transcription factors. GENOMICS **2014**; 104(6 Pt B): 520-9.

Marcin Ratajewski
Łódź, 24.05.2018 r.