

Ocena
dorobku naukowego i rozprawy habilitacyjnej
dr n. biol. Marcina M. Ratajewskiego,
pracownika naukowego Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi

O HABILITANCIE

Ubiegający się o tytuł doktora habilitowanego, doktor nauk biologicznych Marcin Marek Ratajewski z Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi, jest zatrudniony od 2004 r., początkowo na etacie asystenta, a obecnie adiunkta, w Pracowni Regulacji Transkrypcyjnej, w której prowadzi się badania nad regulacją transkrypcji genów ludzkich w odpowiedzi na szkodliwe czynniki środowiskowe. Habilitant ukończył studia magisterskie, a następnie czteroletnie Stacjonarne Studia Doktoranckie na Uniwersytecie Łódzkim na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska (poprzednia nazwa: Wydział Biologii i Nauk o Ziemi) (2004-2008).

Promotorem pracy magisterskiej obronionej w 2004 r., a następnie rozprawy doktorskiej, obronionej w 2009 r., był znany biofizyk prof. dr hab. Grzegorz Bartosz. Praca magisterska nosiła tytuł „Identyfikacja, analiza i klonowanie promotora ludzkiego genu MRP6 (ABCC6)”, a kolejne prace, jakie wykonano w ramach kontynuacji badań, złożyły się na rozprawę doktorską pt.: „Charakterystyka promotora genu ABCC6 związanego z chorobą pseudoxanthoma elasticum”.

Młody, mądry i naukowo prężny, był dr M. Ratajewski stypendystą instytucji krajowych, sponsorujących uzdolnionych badaczy: Ministra Edukacji Narodowej i Sportu (2002-2004); Fundacji na rzecz Nauki Polskiej (stypendium Start, 2010), a ostatnio Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (stypendium dla młodych, wybitnych naukowców, 2015-2018).

Habilitant jest członkiem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Kilkakrotnie przebywał na krótkich stażach naukowych w laboratorium prof. Varadi w Budapeszcie, w Institute of Enzymology, Hungarian Academy of Sciences.

Za osiągnięcia naukowe w latach 2014-2015 otrzymał nagrodę IBM PAN I stopnia. Jest posiadaczem medalu *Veritas et Libertas* (2004). Jest także cenionym recenzentem, zapraszany przez redaktorów czasopism międzynarodowych i krajowych do oceny nadesłanych prac.

OCENA DOROBKU NAUKOWEGO

Dorobek naukowy Habilitanta obejmuje 23 oryginalne prace naukowe, opublikowane w recenzowanych czasopismach anglojęzycznych, dla których łączna liczba punktów MNiSW wynosi

659,0 pkt., a wskaźnik oddziaływania IF 82,027 pkt. Przed uzyskaniem stopnia doktora ukazało się 5 prac, a ich punktacja wyniosła odpowiednio 112 pkt. MNiSW i 21,617 pkt IF.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że Habilitant jest pierwszym autorem w 12, a drugim w 4 publikacjach. Co istotne, prace z udziałem Habilitanta cytowane były dotąd 257 razy - wg bazy Web of Science, a 293 razy wg Scopus. Indeks Hirscha wg wymienionych baz jest równy, odpowiednio, 10 i 11. Świadczy to, że badania dr. Ratajewskiego są ważne i wpisują się doskonale w nurt współcześnie „gorących tematów”.

Duża aktywność naukowa była możliwa dzięki udziałowi w realizacji projektów podejmowanych przez Pracownię Regulacji Transkrypcyjnej i przez samego Habilitanta, pasjonata wiedzy.

Prace badawcze prowadzone były w ramach: i/ 2 projektów międzynarodowych: Polsko-Węgierskiego (współpraca między PAN i Węgierską Akademią Nauk) oraz European Economic Area (EEA); w tych projektach Habilitant był wykonawcą,

ii/ 7 projektów badawczych krajowych, subwencionowanych przez MNiSW (4) oraz NCN (3); w 5 z nich był kierownikiem projektu.

Trzeba dodać, że dr M. Ratajewski był także jednym z wykonawców realizujących badania w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka (POIG) nt. Badania mechanizmów molekularnych na styku organizm ludzki – patogen – czynniki środowiskowe.

Dorobek Habilitanta jest zwarty i dotyczy mechanizmów regulujących transkrypcję genetyczną w komórkach eukariotycznych. Wśród tematów pracy badawczej habilitanta znajdują się prace dotyczące regulacji ekspresji genów związanych z lekoopornością w komórkach czerniaka, regulacji ekspresji genu *HIF1A* kodującego główny komórkowy sensor tlenu i regulacji genów kodujących białka mitochondrialne. Sześć publikacji dotyczy badań nad regulacją promotora genu *ABCC6*, związanego z rzadką chorobą tkanki łącznej, o polskiej nazwie: „kępki żółte rzekome” - *pseudoxanthoma elasticum* (PXE), dziedziczną chorobą wielonarządową, w której dochodzi do zmian strukturalnych włókien elastycznych związanych z ich zwapnieniem w skórze, w siatkówce oka, w układzie krążenia i w układzie pokarmowym. Wiadomo, że istotnym elementem patogenetycznym w tej chorobie są mutacje genu *ABCC6*. Prace habilitanta nad tym zagadnieniem przeprowadzone częściowo przy współpracy z kolegami z Instytutu Enzymologii Węgierskiej Akademii Nauk doprowadziły do szeregu istotnych obserwacji. Ustalono, że jednym z mechanizmów tkankowo swoistej ekspresji *ABCC6* jest metylacja DNA w obszarze promotorowym. W dalszych badaniach stwierdzono, że receptor jądrowy RXR reguluje zależną od retinoidów ekspresję tego genu w wątrobie, a głównym czynnikiem transkrypcyjnym odpowiedzialnym za ekspresję *ABCC6* w tym narządzie jest czynnik HNF4α. Wreszcie, co z punktu widzenia mechanizmów patogenezy choroby PXE wydaje mi się być najbardziej

interesujące, powiązano polimorfizm genetyczny nadreprezentowany u pacjentów z PXE z zależnym od czynników PLAG upośledzeniem ekspresji ABCC6 w hepatocytach.

OCENA OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO DR M. RATAJEWSKIEGO

O ile *pseudoxanthoma elasticum* występuje u 1 na 25 tys. osób lub 1 na 100 tys., choroby autoimmunologiczne, a jest ich ok. 80, dotyczą ok. 5% populacji w krajach rozwiniętych. Najczęściej spotykane: reumatoidalne zapalenie stawów, toczeń rumieniowaty, stwardnienie rozsiane, choroba Gravesa-Basedowa, łuszczyca, zapalenie kłębuszkowe nerek, nieswoiste zapalenie jelit, czy białaczka, są chorobami przewlekłymi i pozostają nieuleczalne. W poszukiwaniu nowych, bardziej skutecznych metod terapii zwrócono w piśmiennictwie uwagę na możliwość hamowania nadmiernej odpowiedzi odpornościowej poprzez modulację funkcji limfocytów Th17, wydzielających niszczące tkanki prozapalne cytokiny, interleukiny 17A i 17F (IL17A i IL17F), limfocytów, które normalnie odgrywają kluczową rolę w obronie gospodarza przeciwko drobnoustrojom *Bacillus anthracis*, *Staphylococcus aureus* i *Candida albicans*. Dr Ratajewski podzielił pogląd, iż szansę takiej regulacji da oddziaływanie na aktywność i /lub ekspresję czynnika transkrypcyjnego ROR γ T/RORC2 (pełna nazwa: *retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma - jądrowy sierocy receptor gamma związany z receptorem kwasu retinowego*), odpowiadającego za różnicowanie komórek CD4⁺ naiwnych do Th 17. Podjął zatem trud zidentyfikowania i scharakteryzowania mechanizmów wpływających na proces ekspresji ludzkiego genu ROR γ T/RORC2 oraz oceny znaczenia tych mechanizmów w procesie różnicowania komórek Th17.

Efektom jego działalności na tym polu są 4 oryginalne prace opatrzone wspólnym tytułem „Molekularne mechanizmy regulacji ekspresji genu ROR γ T” przedstawione jako rozprawa habilitacyjna.

Ukazały się one drukiem w latach 2012-2017, w czasopiśmie indeksowanym w bazie Journal Citation Reports. Ich łączny IF wynosi 17,156 i odpowiednio, 135 pkt. MNiSW.

W pracach zastosowano całą paletę adekwatnych dla dziedziny, współczesnych metod badawczych, przy czym na podkreślenie zasługuje tu różnorodność materiału biologicznego, wykorzystanego do poszukiwania molekularnych mechanizmów regulacji ekspresji genu ROR γ T. Habilitant rozpoczął badania na poziomie *in silico* - od precyzyjnego zaplanowania części eksperymentalnej *in vitro*, tą zaś przeprowadził na hodowlach komórkowych linii Jurkat (human T cell lymphoblast-like), HeLa (cervix carcinoma), HepG2 (hepatocellular carcinoma) oraz na komórkach T pozyskiwanych od zdrowych, anonimowych dawców. Z kolei w ocenie częstości występowania w populacji polskiej czterech polimorfizmów SNP w sekwencji nukleotydów promotora genu ROR γ T, Habilitant skorzystał z kolekcji "POPULOUS" - DNA ekstrahowanego ze śliny, zbankowanego w Laboratorium BioBank na Wydziale

Biofizyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego, w ramach realizacji projektu TESTOPLEK z udziałem 5130 uczestników, deklarujących się jako osoby zdrowe.

Analiza molekularna komórek była prowadzona na poziomie DNA, RNA i białka. Badania DNA obejmowały poszukiwanie zdefiniowanych polimorfizmów i mutacji oraz stopnia metylacji DNA. Mutagenezę prowadzono bezpośrednio na plazmidach (pUC18) zawierających zdefiniowane sekwencje promotora RORyT. Natomiast wyciszanie ekspresji genu Habilitant prowadził metodą nukleofekcji za pomocą docelowego dupleksu siRNA. Indukcję nadekspresji genu prowadził metodą transfekcji konstruktów DNA ludzkiego promotora RORyT. Wydajności prowadzonych modyfikacji oceniał metodą amplifikacji kwasów nukleinowych, testów zmiany ruchliwości elektroforetycznej cząsteczek, EMSA – (ang. electrophoretic mobility Shift assay) oraz immunoprecypitacji chromatyny. Badania na poziomie białka były prowadzone metodą Elisa lub Western Blot; specyficzne prążki wizualizowano za pomocą chemiluminescencji z zastosowaniem substratu chemiluminescencyjnego SuperSignal West Pico (Thermo Fisher Scientific).

Podsumowując, poszukiwania mechanizmów regulacji ekspresji genu kodującego RORgT były prowadzone różnymi metodami często walidującymi się wzajemnie, a także potwierdzającymi wyniki badań bioinformatycznych prowadzonych *in silico*, co znacznie podnosi wartość najważniejszych osiągnięć dr. Marcina Ratajewskiego.

Można gratulować Autorowi doskonale opanowanego warsztatu pracy i tego, że - jak na prawdziwego badacza przystało, jest dociekliwy i konsekwentny.

A najbardziej istotne, wartościowe wyniki tej serii prac to, w mojej opinii, zidentyfikowanie, nieznanej dotąd, sekwencji promotorowej ludzkiego genu RORyT, określenie sekwencji odpowiadających za tkankowo-swoistą specyficzną dla limfocytów aktywność promotora genu RORyT, zidentyfikowanie białek USF-1 i USF-2 jako potencjalnych aktywatorów, i dalej, wskazanie spośród 4 miejsc typu E-box, rozpoznawanych przez białka USF, E-box 2 i E-box 1 jako istotnych dla indukowalności badanego promotora. W tym miejscu warto podkreślić, że odkryte powiązanie RORyT i czynników USF, które wpływają na ekspresję szeregu genów zaangażowanych w utrzymywanie homeostazy energetycznej ustroju, jest oryginalną obserwacją dr. Ratajewskiego i wsp., wskazującą na możliwe powiązanie procesów metabolizmu węglowodanów z różnicowaniem limfocytów CD4+ w kierunku Th17. Jest to bardzo interesujące ze względu na znane już powiązania wywoływanego przez Th17 stanu zapalnego z zaburzeniami metabolicznymi takimi jak otyłość.

Inna oryginalna i ważna obserwacja dotyczy różnic w tkankowo swoistej ekspresji izoform RORy i RORyT; Habilitant pokazał, że u człowieka, inaczej niż u myszy w limfocytach Th17 nie dochodzi do ekspresji obydwu izoform tego genu ale do wyłącznej ekspresji RORyT.

Kolejne istotne osiągnięcie to zidentyfikowanie specyficznego dla naczelnych miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych z rodziny Sp. I tak, stwierdzono, że spośród białek Sp sekwencja DNA zawierająca GC-BOX1 specyficznie wiąże białko Sp2, natomiast sekwencja zawierająca GC-BOX2 wiąże dwa białka: Sp2 jak i Sp1. Uzyskano dowody, że i GC-BOX1 i GC-BOX2 są istotne dla aktywności RORγT, przy czym jako kluczowego regulatora ekspresji RORγT w limfocytach ludzkich wskazano Sp2. Zasugerowano, że blokowanie tego czynnika może być punktem docelowym w terapii chorób autoimmunologicznych.

Dr Ratajewski wykazał też możliwość wystąpienia 4 polimorfizmów w miejscu GC-BOX2, które potencjalnie mogą wpływać negatywnie na ekspresję genu RORγT i w ten sposób osłabiać odpowiedź immunologiczną/odpornościową (polimorfizm rs201107751) lub zmniejszać podatność na choroby autoimmunologiczne (polimorfizmy rs774872314, rs116171003, rs200231898). Kolejnym ważnym z punktu widzenia terapii nowotworów i/lub chorób autoimmunologicznych było odkrycie, że inhibitory deacetylazy histonowej mogą wywołać nie tylko supresję ale i nasilenie ekspresji genu RORγT i że rodzaj odpowiedzi związany jest ze stopniem zróżnicowania komórek Th17. W tym miejscu warto wspomnieć, że jak dotąd cztery związki będące inhibitorami deacetylazy histonowej, zostały zatwierdzone przez FDA jako leki w przypadku chłoniaków.

W mojej opinii, osiągnięcie naukowe dr. Marcina Ratajewskiego, dotyczące modulacji funkcji limfocytów Th 17 poprzez wpływ na aktywność czynnika transkrypcyjnego RORγT, wpisuje się w aktualną tematykę badawczą, a wyniki wykonanych badań, uzyskane przy pomocy arsenału środków i wiarygodnych metod, mają duży potencjał aplikacyjny.

Osiągnięcie to spełnia wszystkie kryteria stawiane rozprawie habilitacyjnej.

DOROBK DYDAKTYCZNY I POPULARYZATORSKI

Dr M. Ratajewski w referacie pt. „Znaczenie epigenetycznej regulacji ekspresji genu HIF1A w komórkach krwi” wygłoszonym na Zjeździe Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej w Gdańsku (2011) przybliżył uczestnikom mistrza transkrypcyjnej odpowiedzi adaptacyjnej na warunki niedotlenienia, Hypoxia-inducible factor 1-alpha (czynnik ten aktywuje ponad 40 genów) i swoje dokonania w zakresie regulacji ekspresji tegoż. Wyniki badań prezentował Habilitant także na 7 konferencjach międzynarodowych (w formie plakatów), uzyskując wyróżnienie za pracę nt. “Liver specific site in the proximal promoter of ABCC6 gene - involvement of PLAG and HNF4 transcription factors” na 3rd FEBS Special Meeting – ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases, Innsbruck 2010.

Warto odnotować, że udział w konferencjach zapewniły dr. M. Ratajewskiemu stypendia przyznane w drodze konkursu przez takie organizacje, jak: Gordon Research Conferences (1), PXE International (2), FEBS (1), czy Polska Sieć Biologii Komórkowej i Molekularnej UNESCO/PAN (1).

Wreszcie, jest współautorem książki, łączącej działalność dydaktyczną z popularyzatorską, pt. „Wiem, że umiesz Biologia - repetytorium dla maturzystów i kandydatów na wyższe uczelnie” wydanej w 2005 r. przez Wydawnictwo Szkolne i Pedagogiczne, autorstwa A. Balcerczyk i inni.

Będąc pracownikiem PAN Habilitant nie prowadzi regularnych zajęć dydaktycznych. Aktywność w tym zakresie realizuje poprzez koordynację działania i opiekę nad magistrantami, wykonującymi w Pracowni Regulacji Transkrypcyjnej swoje prace magisterskie oraz studentami łódzkich uczelni (Uniwersytetu Łódzkiego, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi i Politechniki Łódzkiej), którzy odbywają tam krótkoterminowe staże lub praktyki laboratoryjne.

Po dogłębnym zapoznaniu się z przedstawionym mi do oceny materiałem dokumentującym dokonania Habilitanta, stwierdzam z całą stanowczością, że Pan dr Marcin Ratajewski jest badaczem kreatywnym, ma wspaniale opanowany warsztat pracy, jest dojrzały i samodzielny; umie stawiać pytania i dostosowywać strategie badawcze do rozwiązania problemów naukowych.

Wspiera młodzię w jej pierwszych badaniach naukowych.

A zatem, konkludując - wniosek dr. Marcina Ratajewskiego o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego w dziedzinie nauki medyczne, dyscyplinie biologia medyczna, uważam za całkowicie zasadny.

Zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Nauk o Zdrowiu z Oddziałem Pielęgniarstwa i Położnictwa, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, o dopuszczenie dr. Ratajewskiego do dalszych etapów tego postępowania.

Wiesława Agnieszka Fogel

Łódź, 12. 12. 2018