

Prof. Włodzimierz Maśliński
Zakład Patofizjologii i Immunologii
Narodowy Instytut Geriatrii, Reumatologii i Rehabilitacji,
Spartańska 1
02-637 Warszawa

Ocena

Rozprawy Doktorskiej magister inżynier Joanny Marczyńskiej zatytułowanej:
„Rola metaloproteinazy ADAM17 w zależnej od ICOSL odpowiedzi humoralnej”

Metaloproteinaza ADAM17, podobnie jak inne enzymy należące do rodziny adamalizyn, wykazuje właściwości endopeptydazy i białka adhezyjnego. Zidentyfikowano ponad 80 potencjalnych ligandów dla ADAM17, wśród których znajdują się cytokiny, czynniki wzrostu, receptory, cząsteczki adhezyjne i wiele innych białek. Aktywności proteolityczne ADAM17, poprzez uwalnianie powierzchniowych ligandów regulują wiele procesów fizjologicznych, poczynając od wczesnych etapów rozwoju zarodka. Na kluczową rolę ADAM17 w rozwoju i funkcjonowaniu organizmu, wskazuje wysoka śmiertelność w okresie poporodowym oraz zaburzenia funkcjonowania narządów wewnętrznych u myszy z unieczynnionym genem dla tego enzymu. Te obserwacje z jednej strony podkreślają kluczową rolę ADAM17 dla organizmu, a z drugiej stanowią poważną przeszkodę w badaniu jego funkcji. Obecnie, dzięki rozwojowi technologii CRE/lox, można blokować ekspresję badanych genów w poszczególnych tkankach i liniach komórkowych, lub zachować ich ekspresję na niewielkim poziomie. Takie podejście z jednej strony umożliwia przeżycie myszy, a z drugiej pozwala badać funkcje ADAM17 w wybranych procesach fizjologicznych w warunkach *in vivo* i *in vitro*.

Biorąc to pod uwagę, Autorka postanowiła sprawdzić hipotezę o udziale metaloproteinazy ADAM17 w regulacji humoralnej odpowiedzi immunologicznej. Weryfikacja tej hipotezy jest przedmiotem ocenianej rozprawy doktorskiej.

Praca zawiera 137 stron na które składają się następujące rozdziały: Spis Skróków, Streszczenie (w języku polskim i angielskim), Wstęp, Cel Pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie oraz Bibliografia.

We wstępie Autorka przedstawiła bardzo ważną rolę jaką odgrywają enzymy proteolityczne, które poprzez modyfikacje białek powierzchniowych komórek uczestniczą w regulacji różnorodnych procesów fizjologicznych. Jedną z tych proteaz jest adamalizyna ADAM17, której udział w regulacji odpowiedzi humoralnej stanowił przedmiot badań omawianej rozprawy. W kolejnych podrozdziałach Autorka omówiła budowę ADAM17 oraz modele genetyczne umożliwiające badania nad tym enzymem. Następnie szczegółowo scharakteryzowała ADAM17, jego syntezę, ekspresję na powierzchni komórki oraz mechanizmy aktywacji i hamowania aktywności poprzez naturalne i syntetyczne inhibitory. Przedstawiła rolę ADAM17 w rozwoju organizmu oraz złożony wpływ na układ immunologiczny, w którym uczestniczy jako istotny regulator procesu zapalnego poprzez dostarczanie rozpuszczalnych cytokin prozapalnych i przeciwzapalnych oraz wpływ na proces migracji i adhezji komórek. Nadmierna aktywacja ADAM 17 uczestniczy w patogenezie szeregu chorób charakteryzujących się chronicznym procesem zapalnym. W kolejnej części

Autorka przedstawiła mechanizm przebiegu humoralnej odpowiedzi immunologicznej, w której bardzo ważną rolę odgrywają interakcje pomiędzy limfocytami B i T. Wskazała na kluczową rolę cząsteczek kostymulujących, wśród których szczegółowo omówiła CD28, CD40, ICOS i ich ligandy. Wskazała, że zaburzenia kostymulacji znacząco wpływają na przebieg odpowiedzi immunologicznej.

Ten wstęp jest bardzo dobrym wprowadzeniem do przedstawienia celu pracy, którym było:

1. przetestowanie hipotezy, że ADAM17 może być bezpośrednio zaangażowany w kształtowanie odpowiedzi immunologicznej, oraz
2. poznanie mechanizmu działania ADAM17 w tym procesie.

W następnym rozdziale, Materiałach i Metodach, Autorka przedstawiła szczegółową listę odczynników i linii komórkowych używanych do realizacji projektu. Szczegółowo opisała procedurę produkcji i oczyszczania przeciwciała przeciwko mysiej cząsteczce CD40. Przedstawiła procedury uzyskania 4 genotypów myszy różniących się ekspresją ADAM17 i ICOSL. Opisała procedury wykonywane na myszach, w tym ich immunizację, eutanazję i uzyskiwanie materiału do badań *in vitro*. Wskazała, że wszystkie procedury eksperymentalne dotyczące pracy na zwierzętach zostały pozytywnie zaopiniowane przez Komisję Etyczną do Sprawy Doświadczeń na Zwierzętach, działającą przy Uniwersytecie Jagiellońskim. Kolejno przedstawiła procedury laboratoryjne służące do oznaczeń poziomu immunoglobulin w surowicach, barwienia immunofluorescencyjnego, sortowania limfocytów, transfer wysortowanych limfocytów do myszy biorców, analizy zasiedlania organów limfatycznych, izolacji RNA i przeprowadzania reakcji PCR, hodowli fibroblastów, stymulacji limfocytów B *in vitro* i barwienia immunohistochemicznego. Zastosowanie tych, często skomplikowanych metod badawczych było uzasadnione do osiągnięcia zaplanowanych celów.

W następnym rozdziale, Wynikach Autorka przedstawiła otrzymane wyniki. Za najważniejsze uważam:

1. Potwierdzenie, że limfocyty T i B myszy ADAM17^{ex/ex} (ex/ex) wykazują brak ekspresji prawidłowego genu ADAM17, z równoczesną obecnością mRNA kodującego niefunkcjonalny gen ADAM17 zawierający dodatkowy egzon.
2. Wykazanie, że brak funkcjonalnego ADAM17 na powierzchni limfocytów T i B uniemożliwia „ściananie” L-selektyny po stymulacji komórek PMA.
3. Wykazanie powiększenia węzłów chłonnych i śledziony oraz zwiększenie liczby komórek w tych narządach, bez zmiany ich mikroarchitektury wewnętrznej u myszy z brakiem ADAM17.
4. Wykazanie, że deficyt ADAM17 powoduje zwiększenie liczby centrów rozrodczych co jest powiązane ze wzrostem liczebności i różnicowania limfocytów B w kierunku komórek plazmatycznych.
5. Wykazanie podwyższonej w surowicy ilości specyficznych dla antygeny immunoglobulin o zmienionej klasie (IgG) po immunizacji myszy z deficytem ADAM17.
6. Wykazanie zwiększonej ilości przeciwciał klasy IgG po transferze limfocytów B pochodzących od myszy ADAM17^{ex/ex} do myszy ADAM17^{wt/wt} po immunizacji antygenem.
7. Wykazanie, że cząsteczka ICOSL na limfocytach B jest ligandem dla ADAM17.

8. Wykazanie braku wpływu ADAM17 na oddziaływanie ICOSL-ICOS.
9. Wykazanie, że oddziaływanie ADAM17-ICOSL reguluje siłę humoralnej odpowiedzi immunologicznej.

Przedstawione wyniki potwierdziły użyteczność modelu mysiego wykorzystującego deficyt ADAM17 na limfocytach T i B dla prowadzenia badań nad rolą ADAM17 w regulacji humoralnej odpowiedzi immunologicznej. Rozszerzenie tego modelu mysiego poprzez stworzenie 4 genotypów myszy wykazujących różne kombinacje ekspresji lub jej braku cząsteczek ADAM17 i ICOSL, umożliwiło badanie udziału tych cząsteczek w modulacji humoralnej odpowiedzi immunologicznej. Wyniki te stanowiły podstawę do zaproponowania nowego modelu modulacji humoralnej odpowiedzi immunologicznej przez adamalizinę ADAM17 i ICOSL. W tym modelu, ADAM17, poprzez obniżanie powierzchniowej ekspresji ICOSL kontroluje siłę i/lub czas interakcji ICOSL-ICOS na limfocytach B i T, co powoduje ograniczenie produkcji przeciwciał na pewnym poziomie. W sytuacji braku ADAM17 na limfocycie B, następuje silniejszy i/lub dłuższy czas oddziaływania ICOSL-ICOS, i w konsekwencji wzrost produkcji przeciwciał.

W kolejnej części pracy, Autorka przeprowadziła dyskusję otrzymanych wyników w świetle dostępnych danych literaturowych. Przedstawiła inne modele zwierzęce, które próbowano zastosować do oceny roli jaką pełni ADAM17 w różnych procesach *in vivo*. Wskazała na zalety wybranego przez nią modelu, który wydaje się poszerzać możliwości dotychczas prowadzonych badań. Przytoczona argumentacja jest przekonująca i recenzent przychylił się do wyboru tego modelu do badań roli ADAM17 w modulacji odpowiedzi humoralnej. W kolejnej części Autorka wskazuje, że ADAM moduluje odpowiedź humoralną w centrach rozrodczych, a nie poprzez zmiany syntezy konkretnej cytokiny. Ta interpretacja również jest zgodna z otrzymanymi wynikami. Wyniki, wskazywały również na właściwy wybór jednej z trzech sprawdzonych przez Autorkę metod immunizacji myszy prowadzącej do produkcji przeciwciał o zmienionej klasie. Podkreśla również dane literaturowe, wskazujące na CD40 i ICOSL jako potencjalne substraty dla ADAM17. Przeprowadzone badania wskazały, że poziom ICOSL, ale nie CD40, był skorelowany z aktywnością ADAM17. Pomimo tego, nie udało się stwierdzić bezpośredniego oddziaływania ADAM17 z ICOSL. Autorka przeprowadza analizę potencjalnych mechanizmów, mogących wytłumaczyć rozbieżności otrzymanych wyników, i przedstawia kilka możliwości, które będą musiały być sprawdzone doświadczalnie w następnych badaniach. Jednakże, badania takie, chociaż niewątpliwie interesujące, wykraczają poza ramy obecnej pracy.

Biorąc pod uwagę całość Dyskusji, Autorka wykazała się dobrą znajomością literatury oraz zdolnością logicznego rozumowania i argumentowania. Z tych powodów, recenzent uważa, że Autorka wykazała się zdolnościami charakteryzującymi doświadczonych naukowców, którzy potrafią ocenić wyniki własnych doświadczeń, we właściwy sposób je przedyskutować oraz wskazać na kolejne kierunki badań mających na celu dalsze pogłębienie wiedzy na badany temat.

W kolejnej części pracy Autorka zwięźle podsumowuje uzyskane wyniki, które doprowadziły do sformułowania opisanego powyżej nowego modelu udziału ADAM17 i ICOSL w modulowaniu produkcji przeciwciał.

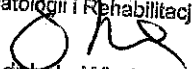
Podsumowując wartość wyników pracy, warto podkreślić, że Autorka po raz pierwszy scharakteryzowała immunologicznie model eksperymentalny z użyciem myszy ze znacznie ograniczoną ekspresją ADAM17. Dzięki temu wskazała, że adamalizyna ADAM17 poprzez

obniżanie powierzchniowej ekspresji ICOSL na limfocytach B, może pełnić rolę negatywnego regulatora humoralnej odpowiedzi immunologicznej.

Cała praca, pomimo bardzo wielu zaprezentowanych wyników, jest napisana bardzo jasno, dzięki czemu czyta się ją z przyjemnością.

Biorąc powyższe pod uwagę, mam przyjemność stwierdzić, że praca odpowiada wymogom stawianym pracom doktorskim i dlatego przedstawiam Panu Dziekanowi i Wysokiej Radzie Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego wniosek o dopuszczenie magister inżynier Joanny Marczyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa, 06.05.2016

Prof. dr hab. Włodzimierz Maśliński
KIEROWNIK
ZAKŁADU PATOFIZJOLOGII I IMMUNOLOGII
Narodowy Instytut Geriatrii,
Reumatologii i Rehabilitacji w Warszawie

prof. dr hab. Włodzimierz Maśliński