UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII
Pracownia Genetyki Molekularnej i Wirusologii
Kierownik
Prof. dr hab. HANNA ROKITA

11 maja 2018 r.

Recenzja
pracy doktorskiej p. mgr Karoliny Wawro
pt „Badanie regulacji ekspresji szedazy ADAM17"

Tematyka przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej dotyczy regulacji ekspresji enzymu proteolitycznego, sekretazy ADAM17 (a disintegrin and metalloprotease 17), metaloproteazy dysintegrynowej zwanej obecnie szedazą (poprzednia nazwa TACE – tumor necrosis factor-α converting enzyme) w wybranych liniach komórkowych i pierwotnych komórkach mysich oraz ludzkich utrzymywanych w hodowli *in vitro*. Badany enzym uczestniczy m.in. w uwalnianiu domeny zewnątrz-błonowej czynnika martwicy nowotworu α (TNF) i innych cytokin, a także receptorów cytokin czy czynników wzrostu z powierzchni różnych typów komórek, np. śródbłonka naczyń. Z tego względu enzym ten odgrywa ważną rolę w wielu procesach, takich jak stan zapalny, migracja komórek czy wzrost naczyń krwionośnych guza.

Autorka rozprawy kontynuuje prace prowadzone w zespole swej promotorki, p. prof. Joanny Berety, w których m.in. wyjaśniono mechanizm akumulacji mRNA dla ADAM17 oraz scharakteryzowano potencjalne czynniki transkrypcyjne, które mogłyby odpowiadać za aktywację genu ADAM17. Analizowano także wpływ endo- i egzo-gennego tlenku azotu na aktywność badanego enzymu oraz określono rolę sekretazy ADAM17 w proteolitycznym uwalnianiu domeny zewnątrz-błonowej receptora typu pierwszego czynnika wzrostu śródbłonka naczyń (VEGFR1). Pokazano także, że ADAM17 pełni rolę w progresji mysiego raka okrężnicy, gdyż wyciszenie genu *Adam17* prowadziło do zahamowania wzrostu guza u myszy i tworzenia naczyń w obrębie guza a czynnik wzrostu naczyń VEGF-A był w tych komórkach znacząco zahamowany.

Przedstawiona praca zawiera obszerny 25 stronicowy **wstęp,** w którym zawarto opis stanu zapalnego ze szczególnym uwzględnieniem czynników prozapalnych i szlaków sygnałowych prowadzących do aktywacji genów.

ul. Gronostajowa 7
30-387 Kraków
tel. +48 (12) 664 6337
email:hanna.rokita@uj.edu.pl

Ponadto przedstawiono charakterystykę genu, transkryptu i białka ADAM17 oraz opis regulacji ekspresji tego genu uzupełniony informacją o ADAM17 jako celu terapii w nowotworach charakteryzujących się zaburzeniem ścieżki sygnałowej prowadzącej od receptorów rodziny naskórkowego czynnika wzrostu. Zamieszczone w tym rozdziale dwa własne schematy stanowią bardzo dobrą ilustrację do szczegółowych opisów.

Rozdział „**Materiały i metody**" (razem 21 stron) zawiera dobry opis stosowanych metod. Szereg informacji, jak np. składy mieszanin reakcyjnych czy sekwencje stosowanych sond zebrano w postaci wielu tabeli. Metody obejmują hodowle komórkowe, izolację makrofagów otrzewnowych, izolację RNA i białek, analizę zawartości transkryptów metodą hybrydyzacji typu Northern czy ilościowej reakcji odwrotnej transkrypcji i łańcuchowej reakcji polimerazy (RT-PCR) i analizę białek metodą Western blotting. Stosowano także test opóźnienia w żelu (EMSA) do badania wiązania białek do DNA oraz barwienia immunofluorescencyjne. W celu znalezienia potencjalnych miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych do promotora mysiego genu *Adam17* przeprowadzono analizę bioinformatyczną z użyciem dostępnych programów. Przeprowadzano następnie klonowanie i mutagenezę ukierunkowaną a tak przygotowane konstrukty zawierające sekwencje rejonu regulatorowego genu ADAM17 przyłączone do genu wskaźnikowego lucyferazy użyto do przejściowej transfekcji komórek śródbłonka naczyń.

Wyniki badań stanowią największy rozdział pracy, zostały przedstawione na 42 stronach i ilustrowane 20-oma w większości złożonymi rysunkami. Autorka kolejno omawia poszczególne etapy doświadczeń poprzedzając je odpowiednimi wprowadzeniami, krótko je w tych częściach rozdziału podsumowując. Należy podkreślić, że we wszystkich doświadczeniach zastosowano odpowiednie kontrole jak np. nietraktowane badanymi czynnikami komórki, które izolowano w początkowych i końcowych punktach doświadczenia. Kontrolą poprawności izolacji frakcji jądrowych było np. oznaczenie obecności białka p65, które powinno być nieobecne w jądrach niestymulowanych komórek. Dla określenia wydajności transfekcji i normalizacji wyników dodatkowo stosowano plazmid kodujący β-galaktozydazę. W większości testów wykonano 3- lub 4-krotne niezależne powtórzenia.

Analiza ekspresji genu *Adam17* w komórkach mysich pozwoliła wykazać, że:

1. TNF i IL-1β w przeciwieństwie do IFNγ, stymulują ekspresję genu *Adam17* na poziomie mRNA i produkcję białka w komórkach mysiego śródbłonka naczyń (MBE).
2. Wzrost ekspresji genu *Adam17* w tych komórkach jest hamowany na poziomie mRNA przez inhibitor szlaku NF-κB - inhibitor VII IKK (inhibitor

kinazy IκB) stosowany w stężeniu nietoksycznym dla komórek. Pokazano to zahamowanie, wykrywając brak translokacji do jądra podjednostki p65 czynnika NF-κB w komórkach traktowanych tym inhibitorem. Tutaj uwaga odnośnie opisu stosowanej metody – białka nie były „wybarwiane na zielono" czy „wybarwiane immunofluorescencyjnie" lecz wykrywane (uwidocznione) dzięki sprzężeniu przeciwciał rozpoznających te białka z barwnikiem wykazującym fluorescencję.

3. LPS także stymuluje ekspresję *Adam17* i przekaz sygnału obejmuje aktywację czynnika NF-κB.

4. Fragment promotora mysiego genu *Adam17* obejmujący 5000 par zasad zawiera 4 potencjalne miejsca wiązania NF-κB ale test migracji w żelu pozwolił wykazać, że tylko miejsce w pozycji -2702/-2679 od startu translacji może wiązać czynnik NF-κB i w skład tego dimeru wchodzi białko p65.

5. Stymulacja ekspresji ADAM17 pod wpływem PMA (diestru forbolu) zależy od kinaz ERK1/2, gdyż związek U0126, inhibitor kinaz MEK1 i MEK2, dla których bezpośrednim substratem są kinazy ERK1/2, hamuje stymulowany przez PMA wzrost poziomu transkryptu i białka ADAM17.

6. W komórkach MBE oprócz PMA także IL-1β i LPS aktywują ERK1/2.

7. Pod wpływem PMA i TNF-u dochodzi do fosforylacji czynnika transkrypcyjnego Elk-1, który jest aktywowany przez kinazę ERK1/2. Jednocześnie pokazano, że dwie inne kinazy MAP - JNK i p38 nie są zaangażowane w regulację ekspresji *Adam17* w komórkach MBE przez czynniki prozapalne i mitogen PMA. Co ważne, w serii doświadczeń poprzedzonych analizą bioinformatyczną miejsc wiązania Elk-1 do promotora *Adam17*, z użyciem białek fuzyjnych zawierających Elk i domenę konstytutywnie aktywną wirusowego białka VP16 czy represorową Engrailed, wykazano, że w obrębie promotora tego genu (połączonego z genem lucyferazy) we fragmencie o długości 408 pz znajdują się 4 miejsca istotne dla wiązania czynnika Elk-1.

8. Mysie makrofagi otrzewnowe stymulowane TNF-em, LPS-em i IL-1β produkują znacznie więcej sekretazy ADAM17.

9. Wzrost ekspresji ADAM17 w aktywowanych makrofagach otrzewnowych ulega zahamowaniu pod wpływem inhibitora glikolizy – 2-deoksyglukozy ale w kontroli metabolicznej ekspresji ADAM17 nie jest istotny czynnik HIF-1.

10. Jedynie w osteoblastach ale nie astrocytach i fibroblastach izolowanych z mysich noworodków cytokiny prozapalne IL-1β i TNF stymulują transkrypcję *Adam17*, co dowodzi, że regulacja ekspresji genu *Adam17* ściśle zależy od typu komórek.

Zdając sobie sprawę ze znaczących różnic w sekwencjach promotorów myszy i człowieka, Autorka zrezygnowała z podejścia *in silico* i do badań ekspresji ludzkiego genu *ADAM17* wybrała dwie linie ludzkich komórek

normalnych i dwie linie nowotworowe. Analizy te pozwoliły wykazać, że gen *ADAM17* podlega regulacji również w komórkach ludzkich a PMA i cytokiny prozapalne stymulują jego ekspresję, podczas gdy czynnik transkrypcyjny NF-κB jest głównym regulatorem jego transkrypcji. Pokazano, że:

1. W komórkach ludzkiego śródbłonka naczyń limfatycznych gen *ADAM17* jest stymulowany przez TNF i PMA, nieznacznie przez LPS, ale brak stymulacji pod wpływem IL-1β. Chociaż w komórkach mysich IL-1β powodowała wzrost ekspresji *Adam17*, to w badanych komórkach ludzkich pomimo wykazania funkcjonowania szlaku aktywacji NF-κB (doświadczenie z inhibitorem kinazy IKK odwracającym obniżenie poziomu IκBα po PMA), nie dochodzi do aktywacji czynnika NF-κB przez tą cytokinę. Szkoda, że tego wątku nie kontynuowano.
2. W ludzkich fibroblastach skórnych gen *ADAM17* ulega stymulacji pod wpływem PMA, TNF i IL-1β. Równoczesne dodanie TNF-u i IL-1β nie prowadzi do dalszego zwiększenia poziomu białka, co zgadza się z dotychczasową wiedzą na temat podobnego mechanizmu działania obu cytokin. Dla cytokin tych obserwowano jednak odmienną kinetykę zmian w poziomach formy niedojrzałej i dojrzałej białka ADAM17.
3. W komórkach linii HeLa wykazujących stabilną ekspresję zmodyfikowanego białka IκBαDN nieulegającego fosforylacji i tym samym degradacji i dlatego zatrzymującego NF-κB w cytoplazmie, PMA i TNF nie prowadzi do zwiększenia ilości formy niedojrzałej białka ADAM17 a poziom formy dojrzałej ADAM17 obniża się pod wpływem PMA.
4. Komórki linii MCF-7 reagują na dodanie PMA wzrostem poziomu transkryptu *ADAM17*, czego nie obserwuje się po dodaniu TNF-u. W kilku innych liniach, dla których nie podano wyników w tej pracy, nie obserwowano jednak żadnych zmian.

Dyskusja wyników pracy jest dość obszerna ale poprowadzona ciekawie. Podzielono ją na 4 części zawierające kolejno komentarz do regulacji ekspresji genu *Adam17* przez czynniki prozapalne, udziału czynnika NF-κB a następnie Elk-1 w regulacji tej ekspresji oraz rozważania na temat wpływu hamowania glikolizy na ekspresję ADAM17. Autorka zawarła uwagi nt poziomu oraz tempa transkrypcji i translacji genu *Adam17* porównując uzyskane wyniki z danymi opublikowanymi przez innych badaczy. Zawarto także rozległe wyjaśnienia dotyczące nieprzydatności metody immunoprecypitacji chromatyny (ChIP) w sprawdzeniu czy miejsca w mysim promotorze genu *Adam17,* dla których nie wykazano funkcjonalności w teście EMSA, nie wiążą jednak NF-κB *in vivo*. Odniesiono się także do przedyskutowania możliwości, że także inne niż NF-κB i Elk-1 czynniki transkrypcyjne mogą być odpowiedzialne za wzrost poziomu ekspresji ADAM17 pod wpływem PMA. Część dyskusji poświęconą wpływowi zahamowania glikolizy na ekspresję badanego genu uzupełniono własnym

schematem przedstawiającym rolę bursztynianu w po-translacyjnej regulacji białka HIF-1α. Autorka zawarła też swoje rozważania nt możliwego udziału 2-deoksyglukozy (poza zahamowaniem glikolizy) w hamowaniu N-glikozylacji białek i związaną z tym procesem działaniem nukleazy IRS1 w degradacji mRNA ADAM17.

Poza dyskusją Autorka zawarła w pracy krótki rozdział „**Podsumowanie**" oraz „**Wnioski**". W Podsumowaniu, Autorka odnosi się do zagadnienia konstytutywnej ekspresji genu *Adam17*, która w świetle dowodów przedstawionych w pracy doktorskiej ulega jednak niewielkim bo najwyżej parokrotnym zmianom pod wpływem typowych czynników prozapalnych. Podkreśla także fakt, iż główny substrat tej proteazy, TNF, sam może stymulować ekspresję genu *Adam17* i poprzez takie sprzężenie zwrotne dodatnie wpływać na rozwój chronicznego stanu zapalnego. Z kolei w 6-ciu krótkich wnioskach podsumowano najważniejsze wyniki zamieszczone w pracy.

Pracę uzupełniają **streszczenia** w języku polskim i angielskim oraz wykaz 24 rysunków i 13 tabel. W spisie **piśmiennictwa** (niesłusznie nazwanym „literaturą") obejmującym 201 pozycji, głównie najnowszych, dwukrotnie (jako nr 121 i 125) wpisano tą samą pozycję (Kasza i in., 2005). Praca jest napisana jasnym poprawnym językiem, jest także bardzo dobrze zredagowana i ilustrowana. Poza kilkoma błędami literowymi nie znaleziono żadnych usterek.

W podsumowaniu, praca zawiera szereg nowych wyników na temat regulacji ekspresji ważnego enzymu proteolitycznego jakim jest szedaza ADAM17, w wielu typach komórek mysich i ludzkich. Zastosowane nowoczesne metody badawcze poprzedzone dogłębną analizą *in silico* dostarczyły wielu oryginalnych dowodów na przebieg stymulacji genu ADAM17 w badanych komórkach.

Stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Karoliny Wawro spełnia warunki określone w art. 13 ust.1 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 z późn. zm.) i wnoszę do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr **Karoliny Wawro** do następnych etapów przewodu doktorskiego.

Hanna Rokita