CENTRUM ONKOLOGII – INSTYTUT
IM. MARII SKŁODOWSKIEJ-CURIE
ODDZIAŁ W GLIWICACH

WWW.IO.GLI

Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów
Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie
Oddział w Gliwicach
Ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15
44-101 Gliwice
e-mail: krawczyk@io.gliwice.pl

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Wawro „Badanie regulacji ekspresji szedazy ADAM17"

Przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Karoliny Wawro mieści się w nurcie badawczym skierowanym na charakteryzowanie funkcji i regulacji ekspresji genu kodującego białko ADAM17 (disintegrin and metalloproteinase 17) nazywane także TACE (TNFα-converting enzyme) należące do grupy enzymów nazywanych szedazami. Białko TACE/ADAM17 stało się przedmiotem intensywnych badań od czasu wykrycia, że jest ono odpowiedzialne za generowanie rozpuszczalnej formy TNF. Obecnie wiadomo, że wymieniona szedaza zaangażowana jest w złuszczanie zewnątrzkomórkowych domen około 80 białek kotwiczących się w błonie komórkowej, wśród których znajdują się cytokiny, czynniki wzrostu, receptory i inne stające się w wyniku tego działania aktywnymi biologicznie białkami rozpuszczalnymi.

Ekspresję genu *Adam17/ADAM17* na poziomie transkryptu i białka wykazano w niemal wszystkich badanych rodzajach komórek. Dotychczasowe badania prowadzone *in vitro* i *in vivo* na modelu mysim, w tym na zwierzętach transgenicznych, wskazują że u myszy szedaza ADAM17 bierze udział w licznych procesach fizjologicznych. Rola ADAM17 u człowieka jest słabiej poznana, wiadomo jednak, że niefunkcjonalność tej szedazy w wyniku mutacji może prowadzić do pojawienia się rozmaitych problemów immunologicznych.

Proces aktywacji funkcji ADAM17 jako szedazy jest złożony i podlega regulacji na wielu poziomach, a dotychczasowe dane wskazują, że działają tu także mechanizmy zależne od rodzaju komórek, od rodzaju substratu, a także od właściwości mikrośrodowiska komórek i procesów transportu pęcherzykowego. O ile końcowe etapy regulujące aktywność ADAM17 były i są nadal przedmiotem intensywnych badań, to znacznie mniej uwagi poświęcono dotychczas zgłębianiu mechanizmów regulacji ekspresji genu na poziomie transkrypcji. Szczegółowy opis wyników dotychczasowych badań zamieszczony przez Doktorantkę w rozdziale „Wstęp" ukazuje jak dalece niedostateczna jest wiedza w tym zakresie, a stąd brak jednoznacznej, klarownej odpowiedzi na pytanie o związek poziomu transkrypcji z aktywnością złuszczającą ADAM17. Istnieją jednak dane wskazujące, że modulowanie aktywności genu ADAM17 na poziomie transkrypcji i translacji może wpływać na prawidłowe funkcjonowania przynajmniej niektórych procesów komórkowych. Przekonanie takie bierze się z obserwacji, że obniżenie poziomu transkrypcji w wyniku zastosowania interferencji RNA powoduje zmniejszenie reakcji komórek na bodźce, czy mediatory prozapalne, natomiast

zwiększenie poziomu transkrypcji, co obserwuje się w komórkach nowotworowych, zmienia ich fenotyp na bardziej w agresywny.

Uznając, że regulacja ekspresji genu *Adam17/ADAM17* nie jest zbyt dobrze poznana, mgr Karolina Wawro postanowiła swoją pracę doktorską poświęcić pełniejszemu scharakteryzowaniu udziału wybranych czynników transkrypcyjnych, które na podstawie wyników badań zespołu w którym pracuje i w oparciu o dane z piśmiennictwa wytypowała jako zaangażowane z wysokim prawdopodobieństwem, w procesie transkrypcji genu *Adam17/ADAM17* w warunkach działania na komórki różnorodnych bodźców. Jako potencjalne czynniki aktywujące ekspresję genu *Adam17/ADAM17* na poziomie transkrypcji Doktorantka stosowała TNF, IL-1β, INFγ, LPS i PMA. Stosując wymienione aktywatory starała się ustalić jak obserwowane zmiany poziomu mRNA korelują z poziomem form dojrzałej i niedojrzałej białka kodowanego przez badany gen w różnych rodzajach komórek oraz scharakteryzować udział wybranych czynników transkrypcyjnych i ścieżek sygnałowych w proces regulacji ekspresji genu *Adam17/ADAM17*. Najpełniejsze, wielokierunkowe badania wykonała Doktorantka na komórkach mysich i opis tych badań można potraktować jako wyodrębnioną pierwszą część doświadczalną. Ponadto, postanowiła wstępnie ocenić w jakim stopniu niektóre obserwacje poczynione na modelu mysim mogą się odnosić do komórek ludzkich i ten fragment badań można potraktować jako uzupełniającą drugą część doświadczalną.

Początkowy etap pracy, to badania wpływu wybranych aktywatorów na ekspresję genu *Adam17* w komórkach mysiego śródbłonka naczyń włosowatych mózgu. Jak wykazała Doktorantka, TNF i IL-1 podnoszą poziom zarówno transkryptu jak i białka, natomiast taki efekt nie występuje w przypadku inkubacji komórek z INFγ. Ponieważ równoczesne stymulowanie komórek TNF i IL-1 nie wywoływało istotnego efektu addytywnego, Doktorantka założyła, że obie cytokiny uaktywniają transkrypcję genu *Adam17* angażując ten sam czynnik transkrypcyjny, najprawdopodobniej NF-κB. Szereg dobrze zaplanowanych eksperymentów potwierdziło, że aktywacji NF-κB towarzyszy wzrost, a hamowaniu aktywności tego czynnika obniżenie poziomu mRNA i białka ADAM17, zatem można uznać, że gen *Adam17* w badanych komórkach znajduje się pod kontrolą tego czynnika transkrypcyjnego.

Logicznym następstwem powyższego wniosku było bioinformatyczne i funkcjonalne charakteryzowanie sekwencji regulacyjnych potencjalnie oddziałujących z NF-κB w promotorze genu *Adam17*. Spośród 4 takich miejsc zlokalizowanych w odcinku DNA o długości 5000 pz. tylko jedno (znajdujące się w odległości około 2500 pz. przed miejscem inicjacji transkrypcji) wskazała Doktorantka, na podstawie wyników uzyskanych z zastosowaniem metody EMSA, jako wiążące NF-κB. Wykazała ponadto, że białkowy kompleks wiążący się wyznaczoną sekwencją regulatorową zawiera podjednostkę p65 czynnika NF-κB, natomiast podjednostki partnerskiej nie udało się zidentyfikować. Dyskutując otrzymane wyniki doktorantka przyznaje, że funkcjonalność tej sekwencji regulatorowej powinna zostać potwierdzona w testach transfekcyjnych.

W dalszej części pracy Doktorantka badając mechanizm stymulowania ekspresji genu *Adam17* przez IL-1β i LPS oraz przez diester forbolu aktywujący kinazę białkową C wykazała,

że stymulacji transkrypcji genu towarzyszy aktywacja ścieżki sygnałowej kinaz ERK1/2. Obserwacja ta skierowała uwagę doktorantki na aktywowany przez ERK1/2 czynnik transkrypcyjny Elk-1 jako kolejny możliwy bezpośredni aktywator transkrypcji genu *Adam17*, co wydawało się tym bardziej uzasadnione, że poziom tego czynnika transkrypcyjnego silnie wzrastał w komórkach w czasie ich inkubacji z PMA i TNF.

Analiza bioinformatyczna wykazała obecność 4 potencjalnych miejsc wiązania Elk-1 we fragmencie DNA o długości około 400 pz. poprzedzającym miejsce inicjacji translacji (około 200 pz. od miejsca inicjacji transkrypcji). Aby wykonać analizę funkcjonalną promotora Doktorantka transfekowała komórki równocześnie wektorami ekspresyjnymi zawierającymi fragmenty promotora genu *Adam17* połączone z genem wskaźnikowym lucyferazy oraz wektorami kodującymi czynnik transkrypcyjny Elk-1 złączony bądź z domenę transaktywującą bądź z represorową. Analiza funkcjonalna połączona z mutowaniem miejsc wiązania Elk-1 wykazała, że każde z nich ma właściwość wiązania tego czynnika i uruchamiania transkrypcji genu wskaźnikowego.

Opisane powyżej badania wykazały, że transkrypcja genu *Adam17* w mysich komórkach śródbłonkowych stymulowanych czynnikami prozapalnymi i mitogenami kontrolowana jest przez ścieżki sygnałowe prowadzące do aktywacji czynników transkrypcyjnych Elk-1 i NF-κB jakkolwiek, jak podnosi Doktorantka w dyskusji, w regulację transkrypcji genu mogą być zaangażowane także inne czynniki transkrypcyjne. Podkreśla również, że na razie trudno rozstrzygnąć czy wszystkie 4 miejsca rozpoznające Elk-1 są równocenne, a także czy wszystkie cztery są angażowane w aktywację transkrypcji genu *Adam17,* czy raczej zachodzi tu zjawisko redundancji. Doktorantka wskazuje także, że regulacja transkrypcji genu *Adam17* może wiązać się z aktywacją ścieżki sygnałowej Raf/Mek/ERK, zwracając uwagę na możliwość krzyżowania się ścieżek sygnałowych aktywujących Elk-1 i NF-κB.

Kolejny etap badań poświęciła Doktorantka charakteryzowaniu mechanizmu ekspresji genu *Adam17* w mysich makrofagach otrzewnowych wykazując, że pod wpływem TNF, LPS i IL-1β poziom mRNA i białka kodowanego przez gen znacząco wzrasta. Natomiast PMA ma niewielki wpływ na aktywność genu, a w przypadku INFγ pewien wzrost transkryptu *Adam17* widoczny jest dopiero po 24 godzinach stymulacji. Jednym z elementów badań ekspresji genu *Adam17* w makrofagach była próba ustalenia roli czynnika transkrypcyjnego HIF-1 w modulowaniu ekspresji genu. Analizując wzór stymulowanej ekspresji genu *Adam17* w warunkach normoksji, pseudohipoksji i hipoksji Doktorantka wyciągnęła wniosek, że zaangażowanie HIF-1 w regulację ekspresji genu *Adam17* w badanym przez nią układzie jest nieznaczne. Ponieważ w piśmiennictwie istnieją zróżnicowane dane dotyczące wpływu HIF-1 na aktywność genu *Adam17* Doktorantka sugeruje, że na razie jedynym wytłumaczeniem istniejących kontrowersji jest przyjęcie, że wynikają one z zachodzenia efektów swoistych komórkowo. Końcowy etap badań prowadzonych na komórkach mysich poświeciła Doktorantka badaniu ekspresji genu ADAM17 w astrocytach, fibroblastach i osteoblastach izolowanych z mysich noworodków. Wynik wykonanych badań skłonił Doktorantkę do wyciągnięcia wniosku, że wzór ekspresji *Adam17* jest w znacznym stopniu zależny od zastosowanego aktywatora i od rodzaju komórek.

Mimo, iż zasadniczym celem badań było scharakteryzowanie ekspresji genu *Adam17* w kilku rodzajach komórek mysich, Doktorantka poszerzyła zakres badań chcąc sprawdzić jak dalece niektóre właściwości ekspresji tego genu ujawnione w wyniku badania mysich komórek wyrażą się w komórkach ludzkich. Ten etap pracy ma charakter badań wstępnych, których celem miało być raczej uzyskanie wskazówek co do kierunku przyszłych poszukiwań, aniżeli prowadzenie dogłębnych analiz.

Badając ekspresję genu *ADAM17* w komórkach śródbłonka naczyń limfatycznych Doktorantka wykazała, że stosunkowo silnymi stymulatorami transkrypcji tego genu są PMA i TNF, natomiast LPS stymuluje ekspresję genu słabiej, a IL-1β nie powoduje zmian poziomu transkrypcji, co może być spowodowane, jak sądzi Doktorantka, brakiem receptora dla tej cytokiny, lub brakiem jakiegoś elementu szlaku sygnałowego. Z kolei w fibroblastach dermalnych ekspresja ADAM17 była stymulowana na poziomie transkryptu i białka przez TNF, PMA i IL-1β, przy czym Doktorantka zauważyła, że działania estru forbolu i TNF nie są równocenne jeśli chodzi o poziom i kinetykę pojawiania się formy dojrzałej i niedojrzałej białka ADAM17. W komórkach HeLa TNF silniej stymulował transkrypcję genu ADAM17 niż PMA. Transfekcja komórek transgenem eksprymującym niedegradowalną formę inhibitora czynnika transkrypcyjnego NF-κB w cytoplazmie znacznie zmniejszyła poziom aktywacji genu *ADAM17,* co wskazuje, że wymieniony czynnik jest elementem regulacyjnym „trans" tego genu. Z kolei w komórkach MCF-7, odmiennie niż w komórkach HeLa PMA powodował wzrost ekspresji genu *ADAM17,* natomiast TNF nie zmieniał poziomu ekspresji. Powyższe wyniki wyraźnie wskazują, że gen *ADAM17* jest transkrybowany także w komórkach ludzkich, przy czym jego wzór ekspresji może być znacznie zróżnicowany; zależny od natury aktywatora i rodzaju komórek.

Praca doktorska ma standardowy układ i zawiera następujące rozdziały: „Podziękowania", „Spis treści", „Spis skrótów", „Wstęp" (25 stron), „Cel pracy", „Materiały i metody" (21 stron), „Wyniki" (42 strony), „Dyskusja wyników" (19 stron), „Wnioski", „Wykaz rysunków", „Wykaz tabel" oraz bibliografię (20 stron, 201 cytowań), a także wymagane streszczenia w języku polskim i angielskim. Napisana jest czcionką „Times New Roman" (wielkość czcionki 12, odstęp między wierszami 1,5) i ma objętość 135 stron. Bardzo szczegółowy opis części metodycznej i doświadczalnej uzupełniany w istotnych momentach wyjaśnianiem mechanizmu stosowanych metod badawczych i uzasadnieniem ich zastosowania do rozwiązania określonego problemu oraz dbałość o formę graficzną powoduje że rozprawa napisana jest bardzo czytelnie i łatwo można śledzić tok myślenia Doktorantki. Szczegółowy opis wyników innych zespołów badających mechanizmy regulacji ekspresji genu *Adam17/ADAM17* zamieszczony w rozdziale „Wstęp", ukazuje jak dalece niedostateczna jest wiedza o regulacji ekspresji badanego genu i podkreśla istotę i wagę celu badań doktorantki. W swoich badaniach mgr Karolina Wawro posługiwała się wieloma metodami, jak hodowle komórkowe, izolowanie makrofagów otrzewnowych, test MTT, otrzymywanie bakterii kompetentnych, klonowanie i mutageneza ukierunkowana, transfekcyjne testy przejściowe z zastosowaniem wektorów ekspresyjnych z genem wskaźnikowym lucyferazy, izolowanie RNA, elektroforeza RNA, RT-PCR i q-RTPCR, analizę Northern i Western, test opóźnienia migracji w żelu (EMSA), oraz analiza bioinformatyczna.

Chciałbym podkreślić, że w pracy doktorskiej bardzo wiele starań poświęciła Doktorantka ustalaniu warunków doświadczalnych gwarantujących otrzymanie wyników wiarygodnych. W rozdziale „Dyskusja" Doktorantka oprócz dokonania syntezy wyników własnych badań i przytaczania argumentów uzasadniających wiarygodność otrzymanych wyników wymienia również szereg obiektywnych przyczyn, które powodowały, że nie wszystkie eksperymenty przyniosły dostatecznie precyzyjne dane. W dyskusji jest nieco spekulacji, co jednak wobec złożoności badanych problemów jest moim zdaniem uzasadnione. Ponadto, pewne dywagacje prowadzą do nadzwyczaj interesujących propozycji badawczych, np. sprawdzenia czy transkrypt genu *Adam17* w warunkach wystąpienia stresu siateczki śródplazmatycznej może być substratem nukleazy IRE1.

Rozprawa doktorska mgr Karoliny Wawro jest pierwszym badaniem podstawowych mechanizmów regulujących ekspresję genu ADAM17 przeprowadzonym na wielu rodzajach komórek i z zastosowaniem kilku czynników aktywujących transkrypcję genu. Nie mam zasadniczych uwag do strony merytorycznej projektu czy sposobu dyskusji wyników. Nieliczne uwagi, wątpliwości i zapytania przedstawiam poniżej:

- Str. 5. Tabela skrótów. 1. Tabela jest niepełna. 2. Czy w odniesieniu do ADAM17 nie powinno się pisać raczej metaloproteinaza **dezin**tegrynowa niż **dysin**tegrynowa? 3. Odnośnie cDNA; komplementarny DNA – do czego?
- Str. 33. W rozdziale „Materiały i metody" w punkcie „Cytokiny i inne czynniki" nie jest podane pochodzenie INFγ.
- Str. 53/54. W początkowej części tekstu podana jest informacja, że w badaniach dr Bzowskiej obserwowano w komórkach mysiego śródbłonka stymulację genu *Adam17* przez INFγ, natomiast w swoich badaniach Doktorantka takiego efektu nie wykazała? W swojej pracy dr Monika Bzowska stosowała rekombinowany ludzki INFγ, natomiast w pracy doktorskiej mgr Katarzyny Wawro stosowano mysi INFγ. Czy nie powinno się zatem badań mechanizmów regulacji ekspresji genu *Adam17/ADAM17* prowadzić na układach homologicznych?
- Str. 61. Niewykrycie obecności podjednostki p50 czynnika NF-κB w teście opóźnienia migracji tłumaczy Doktorantka tym, że najprawdopodobniej otrzymała/zakupiła wadliwe przeciwciało. Czy wadliwość użytego przeciwciała została potwierdzona?
- Str. 63. Tytuł podrozdziału sugeruje, że będzie opisany jedynie wpływ inhibitora na aktywność genu *Adam17*, a tymczasem jest to bardzo rozbudowana wielowątkowa część pracy doktorskiej.
- Str, 75 rycina 15, panel C. W opisie podano, że rycina obrazuje wynik z trzech niezależnych eksperymentów. Na rycinie są jednak wyniki dwóch analiz.
- Str. 114. Rozdział „Wnioski" to raczej podsumowanie wyników, natomiast ważne wnioski można znaleźć w rozdziałach „Podsumowanie" i „Dyskusja".
- W tekście bardzo często pojawia się zwrot „ekspresja białka ADAM17", czy zwrot „wzrost ekspresji ADAM17". Są to, podobnie jak zwrot „stymulacja białka Adam17" skróty myślowe należące do laboratoryjnego slangu.
- Pozycje w spisie piśmiennictwa nie mają jednolitego zapisu (np. w odniesieniu do zapisu stron). Ponadto niektóre cytowane prace przeglądowe nie są najświeższe (np.

mechanizm działania 2-DG, poz. 137 z 2008 roku) można znaleźć bardziej aktualne opracowania.

Podsumowanie oceny

Badania opisane w rozprawie doktorskiej mgr Karoliny Wawro są pierwszą próbą przeprowadzenia badań mechanizmu aktywacji genu *Adam17/ADAM17* uwzględniających równocześnie użycie różnorodnych linii komórkowych, w tym mysich i ludzkich, użycie kilku aktywatorów ekspresji genu oraz wykonanie badań także w warunkach mikrośrodowiska mogących wywoływać w badanych komórkach stres hipoksyjny, stres siateczki śródplazmatycznej i cytoprotekcyjną reakcję UPR. Badania Doktorantki mają dużą wartość naukową i znacznie poszerzyły wiedzę o właściwościach genu *Adam17/ADAM17*. Bez wątpienia cel badań pracy doktorskiej został osiągnięty, aczkolwiek odnoszę wrażenie, że doktorantka spodziewała się uzyskania bardziej jednorodnych wyników. Tymczasem okazało się, że zaangażowanie czynników transkrypcyjnych, poziom transkrypcji genu ADAM17, poziom bezpośredniego produktu translacji (probiałka), jak i poziom formy dojrzalej, a także możliwe wzory potranslacyjnej modyfikacji, mogą zależeć od rodzaju komórek, od czynnika stymulującego i odwarunków środowiska. Jest to obserwacja nadzwyczaj istotna, ponieważ z jednej strony pozwala zrozumieć istniejące w piśmiennictwie dotyczącym tematu badań kontrowersje, a z drugiej podkreśla konieczność zmiany strategii badań dotyczących relacji pomiędzy ekspresją genu i funkcją ADAM17. To, co wydaje się w oczywisty sposób wynikać z badań doktorantki, to konieczność równoczesnego badania zmian zachodzących na każdym z poznanych etapów ekspresji i regulacji genu, oraz dojrzewania i aktywacji białka w odniesieniu do każdych badanych warunków i każdych badanych komórek. Powyższa uwaga powinna jest ważnym wnioskiem wynikającym z badań opisanych w rozprawie doktorskiej.

Uważam, że rozprawa doktorska mgr Karoliny Wawro stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i całkowicie spełnia wymagania formalne i merytoryczne stawiane pracom doktorskim określone w art. 13 ustawy o stopniach i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 wraz z późniejszymi zmianami. Wnioskuję zatem do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Karoliny Wawro do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Gliwice, 14 maja 2018 r.

Zdzisław Krawczyk

Prof. dr hab. Zdzisław Krawczyk