

Ocena

rozprawy na stopień naukowy doktora nauk medycznych mgr Wandy Niepiekło-Miniewskiej z Laboratorium Immunogenetyki i Immunologii Tkankowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu pt.

Badanie związku genów KIR i HLA oraz maszynerii prezentującej antygen z podatnością i przebiegiem atopowego zapalenia skóry.

Atopowe zapalenie skóry (AZS) jest chorobą znaną od niepamiętnych czasów. Kojarzone jest zwykle z dziećmi, ale występuje, choć rzadziej, u dorosłych. Jest przyczyną wielu uporczywych, trudno gojących się zmian skórnych i przykrych dolegliwości manifestujących się bólem i świądem skóry. Patogeneza choroby pozostaje niewyjaśniona, ale wiele danych sugeruje jej podłoże immunologiczne. Przemawia za tym wzrost stężenia immunoglobuliny E w surowicy, przewaga limfocytów Th2 nad TH1, istotne podwyższenia poziomu cytokin, zwłaszcza prozapalnych, wzrost limfocytów Treg we krwi i w skórze, pojawienie się receptora FcεR1 o wysokim powinowactwie do IgE na komórkach Langerhansa a także na zapalnych komórkach dendrytycznych naskórka (IDEC) występujących tylko w AZS. Chorobie towarzyszy zwykle wyraźna eozynofilia, upośledzenie fagocytozy, chemotaksji a także aktywności komórek NK. AZS często kojarzy się, zwłaszcza u pacjentów w wieku rozwojowym, z astmą i przewlekłym nieżytem nosa. Wszystko to jednak nie tłumaczy etiologii choroby i w jej poszukiwaniu wielu badaczy zwróciło uwagę na rolę czynników środowiskowych oraz na aspekty genetyczne. Już wcześniej zauważono, że ryzyko wystąpienia choroby jest znamienne wyższe u bliźniąt monozygotycznych niż u dwuzygotycznych. Badania, będące także przedmiotem obecnej pracy, dotyczyły wykrycia loci podatności na AZS, mutacji w genie kodującym filagrynę (FLG) ważnego białka warunkującego obecność i spajanie włókien keratyny w keratynocytach i inne. Badania wykonane przy użyciu analizy GWAS, metody asocjacyjnej oceny całego genomu, a także jej odmiany, analizy Immunochip ograniczonej do regionów genomu znanych z powiązania z chorobą, pozwoliły na weryfikację 16 do 19 regionów genomu jako obszarów łączących się ze zwiększonym ryzykiem występowania AZS. Kandydatka zamieszcza we Wstępie pracy tabelę będącą podsumowaniem badań wielu autorów, obejmujące setki a nawet tysiące przebadanych chorych z różnych grup etnicznych, z podaniem zmian w konkretnych chromosomach i wytypowaniem podejrzanych genów. Z tabeli wynika, że zagadnienie etiologii AZS pozostaje wciąż otwarte, a także że kierunek poszukiwań przyczyn genetycznych choroby może być niewłaściwy. Stąd, zmiana podejścia badawczego do omawianego problemu przez Autorkę może być jak najbardziej słuszna. Warto tu nawiasem dodać, że znaczenie poszukiwań zaburzeń genetycznych w chorobach człowieka wyraźnie rośnie, gdyż pojawiają się narzędzia pozwalające modyfikować określone obszary genomu, jak choćby technologia CRISPR/Cas.

Autorka wybrała kilka dróg szczegółowej analizy genetycznej w badaniach nad AZS, dotąd niepodjętych, a mianowicie ocenę genów kodujących KIR na komórkach NK (ale także obecnych na zróżnicowanych limfocytach T pamięci) oraz genów cząsteczek maszynerii prezentacji antygeny (AMP) w ligandach komórek NK tzn. cząsteczek MHC klasy I. Ten zestaw wydaje się logiczny, choćby ze względu na współdziałanie komórek NK i ich ligandów. Badane geny receptorów KIR, zlokalizowane na chromosomie 19 w kompleksie receptorów leukocytarnych (LRC), obejmują klaster 17 genów, cechują się wysokim polimorfizmem a także niezmiennością w czasie. Szczegółowe cele pracy (n=8) obejmowały szereg konkretnych aspektów jak częstość występowania genów KIR, epitopów HLA-C, HLA-B, HLA-A w grupie chorych na AZS i w grupie kontrolnej, ocenę występowania wariantów polimorficznych genów maszynerii prezentacji antygeny, ich oddziaływań i inne. Jest to więc zakres badań bardzo szeroki, jednak ściśle powiązany z kierunkiem i celami badawczymi pracy. We Wstępie

PAN - Instytut Immunologii
Wpł. dnia 28-12-2020
L.dz. 848

znajduje się szczegółowy opis aspektów genetycznych i czynnościowych elementów komórek przewidzianych do badania.

Materiał badawczy obejmował imponującą liczbę genomowego DNA izolowanego z krwi obwodowej 441 pacjentów z AZS uzyskanych z różnych ośrodków polskich. Grupę kontrolną stanowiło 570 zdrowych, niespokrewnionych osób. Stopień rozwoju choroby oceniano współczynnikiem SCORAD. Opis Materiałów i Metod charakteryzuje wysokie uszczegółowienie z podaniem nie tylko starterów sensownych i antysensownych, ale i długości produktów reakcji PCR, nie wspominając już o warunkach amplifikacji. Geny *KIR* oznaczano metodą multipleks PCR-SSP. Dotyczyło to nie tylko genów *KIR* ale także oznaczeń polimorfizmu HLA-C a także genów maszynierii prezentacji antygeny (APM) genów kodujących LMP2 i LMP7 czy genów kodujących cząsteczki TAP1 i TAP2. Dla składowych APM, aminopeptydaz ERAP1 i ERAP2 badano także aktywność enzymatyczną w miejscu polimorficznym wobec ligandu HLA-C.

Wyniki obejmują 37 stron tekstu i stanowią największą część rozprawy. Jednym z pierwszych wykazanych danych było wykrycie znacznie niższej częstości występowania genu *KIR2DS1*, co kojarzyło się z dwukrotnie niższym ryzykiem zachorowania na AZS. Inny gen, *KIR2DS4*, będący w nierównowadze sprzężeń z *KIR2DS1* okazał się być związany z wyższym ryzykiem rozwoju AZS. W analizie częstości haplotypów genów *KIR* okazało się, że haplotypy pozbawione genu *KIR2DS1* w populacji chorych stanowiły 7,5%. Gen *KIR2DS1* występował też rzadziej z chorobami współistniejącymi z AZS jak astma, zapalenie spojówek czy alergiczny nieżyt nosa. Nie udało się jednak wykazać istotnych zależności pomiędzy występowaniem ligandów genów *KIR* a danymi klinicznymi. Porównano także częstość występowania alleli HLA-C u chorych na AZS. Stwierdzono jedynie związek z allelami *HLA-C*05*, którego występowanie zmniejszało dwukrotnie szanse na rozwój AZS. Ocena częstości genotypów badanych polimorfizmów w genach *LMP2* i *LMP7* pozwoliła na wykazanie, że w miejscu polimorficznym *rs 2071543* większość chorych była homozygotami (85%). Ciekawe dane uzyskała autorka w badaniach związków polimorfizmów ERAP1 i ERAP2 z podatnością na AZS. W *ERAP1* wszystkie badane polimorfizmy znajdowały się w regionach kodujących, natomiast, w *ERAP2* jeden polimorfizm był w sekwencji kodującej a drugi w niekodującej. Miejsce polimorficzne *rs 26618* wykazywało związek z ryzykiem zachorowania na AZS. Analiza genotypów w miejscu polimorficznym *rs 26618* wykazała, że osoby, heterozygoty CT i homozygoty CC były bardziej podatne na AZS niż homozygoty TT. W odniesieniu do ERAP2 istotne okazało się miejsce polimorficzne *rs 2248374*. Osoby mające genotyp homozygotyczny *ERAP2 rs 2248374*AA* i *ERAP1 rs 26618*C/C* cechowały się trzykrotnie wyższym ryzykiem rozwoju AZS niż chorzy z innymi genotypami. Podjęto również próbę korelacji obecności polimorfizmu *ERAP* z danymi klinicznymi. Wykazano między innymi, że homozygoty GG w miejscu polimorficznym *rs 27044* wykazywały w późniejszym wieku objawy AZS niż heterozygoty GG i homozygoty CC. W odniesieniu do genu *ERAP1* zauważono, że homozygoty TT w miejscu polimorficznym *rs 2287987* były rzadsze u osób skojarzonych z alergicznym nieżytem nosa. Wszystkie wyniki są poparte dogłębną analizą statystyczną. Autorka korzystała również ze znanych praw i rozkładów danych stosowanych w genetyce, jak rozkład Hardy'ego-Weinberga, czy numeryczną metodę Monte Carlo. TA ostatnią wykorzystała do opisu zmian ilorazu szans (OR).

W podsumowaniu Wyników należy stwierdzić, że uzyskane korelacje są oryginalne i dobrze udokumentowane. Szkoda jednak, że autorka nie poszukiwała także związków genetycznych z nasileniem i zróżnicowaniem objawów klinicznych według danych współczynnika SCORAD u chorych na AZS. Uwaga ta jednak absolutnie nie obniża wartości uzyskanych wyników przez Autorkę.

W Dyskusji Kandydatka poświęciła dużo miejsca ochronnemu działaniu genu *KIR2DS1* u chorych z AZS. Interesujące jest że ten gen ma działanie przeciwstawne w tuszczycy, w której większa podatność na wystąpienie objawów, Okazało się na podstawie danych z piśmiennictwa, że różnicom

w objawach klinicznych obu jednostek towarzyszą zmiany w obrębie limfocytów. W AZS przeważają komórki TH2 i NK2, podczas gdy w łuszczycy występuje przewaga limfocytów Th1, Th17/IL23 i NK1. W dalszej części dyskusji Autorka odnosi zmienność genotypów *KIR* do różnorodności ligandów *KIR*, tzn. do antygenów układu zgodności tkankowej (HLA-A, B, C) znanych ze skrajnego polimorfizmu. Zwróciła uwagę, że locus C (HLA-C) dzieli się na 2 grupy: C1 zawierający asparaginę i C2 – lizynę. Obie grupy wiążą różne cząsteczki *KIR*. Inną ciekawą obserwacją Autorki były różnice w diagnozowaniu AZS w zależności od wieku. U młodszych pacjentów częściej występował epitop C1 a także *allel HLA-C** wykryty przez Autorkę, a u starszych epitop HLA-B Bw4. Interesującym akapitem dyskusji są rozwiązania dotyczące edukacji komórek NK. Okazuje się, że określone allotypy HLA-B i HLA-C promują edukację komórek NK za pośrednictwem receptorów *KIR*. Wiele miejsca w dyskusji poświęciła Autorka znaczeniu i zmienności cząsteczek APM. Polimorfizmy w genach *LMP2* i *LMP7* w miejscu polimorficznym *rs1351383* u nosicieli allelu C (CC i AC) wiązały się z manifestacją AZS we wcześniejszym wieku i cięższym przebiegiem. Jest to oryginalne odkrycie Autorki, ale wymagające potwierdzenia na większych grupach chorych. Polimorfizm genów *ERAP1* i *ERAP2* kodujących aminopeptydazy siateczki śródplazmatycznej okazał się istotny w określaniu ryzyka zachorowania na RZS. Dotyczyło to zwłaszcza miejsca polimorficznego *rs 26618 ERAP1* i analizy genotypów. Osoby z genotypem homozygotycznym *ERAP2 rs 2248374*AA* i wyżej wymienionym *ERAP1* miały 3-krotnie wyższe ryzyko nabycia AZS niż osoby mające inne genotypy. Jest to również oryginalna obserwacja Autorki. Dyskusję kończy wniosek ogólny i 6 wniosków szczegółowych, będących odbiciem głównych znalezisk Autorki. Całość dyskusji oceniam ogólnie wysoko ze względu na szczegółową narrację, umiejętność korelacji z danymi z piśmiennictwa i logiczny wywód na bazie uzyskanych wyników. Pewnym minusem jest zbyt dużo danych o charakterze wyników zawartych w dyskusji. Bibliografia obejmuje 225 aktualnych pozycji, bardzo dobrze dobranych i wykorzystanych w tekście. W pracy znajduje się ponadto 46 tabel dokumentujących głównie wyniki oraz 26 kolorowych rycin dobrej jakości o podobnym przeznaczeniu. Całość drukowanego tekstu liczy 161 stron.

Na końcu rozprawy czytelnik może się zapoznać z dotychczasowym dorobkiem naukowym Kandydatki. Oprócz 2 prac już opublikowanych, będących częścią uzyskanych wyników w obecnej pracy, jest tu 10 pozycji, wyłącznie anglojęzycznych, przyjętych w znanych czasopismach międzynarodowych, 48 doniesień zjazdowych a także czynny udział w 8-10 projektach badawczych.

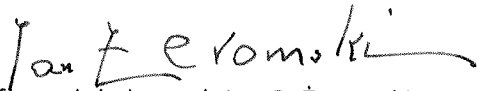
Wnioski końcowe

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Wandy Niepiekło-Miniewskiej spełnia z nadmiarem wszelkie warunki wymagane na stopień naukowy doktora. Zawiera wiele oryginalnych danych dotyczących genetycznych odchyłeń powiązanych z powstaniem i przebiegiem atopowego zapalenia skóry. Została przygotowana starannie, posiada bogatą dokumentację i obszerne piśmiennictwo.

Stawiam wniosek do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgr Wandy Niepiekło-Miniewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie postuluję wyróżnienie rozprawy.

Poznań, 28.12.2020 r.


Prof. zw. dr hab. med. Jan O. Żeromski