



UNIwersytet
Warszawski



Wydział Biologii
Instytut Mikrobiologii, Zakład Genetyki Bakterii
prof. dr hab. Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-Krynicka
e-mail kjkryn@biol.uw.edu.pl
Tel. (+48)22 55 41 216

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr A. Wong – “Citrullination of LL-37 as a mechanism that selectively controls immunostimulatory potential of DNA”

Promotor – dr hab. Joanna Koziel

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Alicji Wong została przygotowana w Zakładzie Mikrobiologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Promotorem rozprawy jest dr hab. Joanna Koziel. Badania finansowane były z funduszy trzech projektów; dwu programów ramowych Wspólnoty Europejskiej i projektu Sonata Bis Narodowego Centrum Nauki. Grupa badawcza kierowana przez prof. dr hab. Jana Potempę od wielu lat zajmuje się wyjaśnianiem mechanizmów oddziaływania bakterii patogennych z organizmem gospodarza, ze szczególnym uwzględnieniem patogenów będących czynnikami etiologicznymi zapalenia przyzębia czyli paradontozy. Obiektem badań recenzowanej rozprawy doktorskiej jest antybakteryjny peptyd LL-37, należący do klasy katelicyn. Zainteresowanie tą grupą peptydów, wytwarzanych przez organizmy zaliczane zarówno do Prokaryota jak i Eukaryota, związane jest głównie z ich aktywnością antybakteryjną, antygrzybiczą oraz antywirusową. Narastająco lawinowo liczba szczepów bakteryjnych opornych na stosowane w terapiach antybiotyki stanowi poważny problem służb medycznych i wymusza przyspieszenie badań nad nowymi skutecznymi metodami terapii. Antybakteryjne peptydy, a opisanych jest aktualnie już około 3000 tych peptydów, mogą potencjalnie stanowić nową grupę leków antybakteryjnych. Główny, choć nie jedyny, mechanizm antybakteryjnego działania antybakteryjnych peptydów polega na ich wbudowywaniu się w osłonę komórkową co doprowadza do śmierci komórki docelowej.

Ludzki peptyd LL-37 jest 37 aminokwasowym peptydem wytwarzanym, jak i inne katelicydiny, w formie pre-pro-peptydu o silnej aktywności antybakteryjnej. Dodatkowo, jak wykazano uprzednio, peptyd ten wykazuje wielokierunkowe działanie immunomodulacyjne, a deiminacja reszt argininy peptydu przez deiminazy peptydylo-argininowe – PAD - (inaczej cytrulinacja; konwersja dodatnio naładowanej argininy do neutralnej cytruliny) ma wpływ na jego funkcje biologiczne. Uprzednio badano mechanizmy oporności patogenów na działanie LL-37, głównie działanie proteaz degradujących LL-37 oraz wykazano rolę jego potranslacyjnych modyfikacji w modulacji efektu prozapalnego, indukowanego przez oddziaływanie LPSu komórek bakteryjnych z receptorami TLR. Zainteresowanie mgr A. Wong wzbudził inny, stosunkowo mało poznany aspekt roli biologicznej LL-37; eksperymenty były ukierunkowane na analizę regulacji procesów immunomodulacyjnych wywoływanych przez kompleksy LL-37 z DNA oraz wyjaśnienie roli potranslacyjnych zmian LL-37 w tym procesie.

Rozprawa doktorska, przygotowana w języku angielskim, ma układ klasyczny, a więc poza wstępem zawiera rozdziały opisujące zastosowane materiały i metody, wyniki przeprowadzonych eksperymentów oraz ich dyskusję. Rozprawę uzupełnia spis literatury (145 pozycji), streszczenie w języku polskim i angielskim oraz podsumowanie wyników w którym doktorantka przedstawiła w punktach najistotniejsze według jej oceny osiągnięcia swojej rozprawy doktorskiej. Wysoki procent cytowanych publikacji to prace z ostatnich lat, opublikowane po roku 2010, co nie budzi zdziwienia ponieważ badane procesy, modulacja działania układu odpornościowego przez antybakteryjne peptydy, są analizowane stosunkowo niedawno.

Wstęp do rozprawy wprowadza w tematykę badań. Zawiera zarówno krótką charakterystykę antybakteryjnych peptydów, opisuje budowę, potranslacyjne modyfikacje LL-37 jak i fizjologiczną rolę peptydu. Dodatkowo przedstawiono informacje dotyczące rozpoznawania i indukcji odpowiednich szlaków sygnalizacyjnych w komórkach układu odpornościowego przez DNA, mechanizmy pozwalające rozróżnić komórkom układu odpornościowego DNA patogenów od własnego materiału genetycznego. Ten aspekt jest szczególnie istotny w świetle informacji, że przełamanie procesów tolerancji może być elementem indukcji chorób autoimmunizacyjnych. Ostatnie rozdziały wstępu omawiają problemy związane z tworzeniem zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilnych (NET) i roli LL-37 w regulacji ich aktywności. Z tego krótkiego przeglądu zagadnień omawianych we wstępie rozprawy jasno wynika jak trudnym zadaniem było jego przygotowanie; wymagało ono głębokiej wiedzy dotyczącej wielu aspektów funkcjonowania układu odpornościowego. Uważam, że doktorantka sprostała temu wyzwaniu.

Metodyka badań obejmowała różnorodne techniki, zarówno z zakresu biologii molekularnej jak i immunologii. Zostały one opisane poprawnie i dostatecznie szczegółowo aby umożliwić

ewentualne powtórzenie eksperymentów. Często wyniki eksperymentów były weryfikowane przy zastosowaniu kilku strategii badawczych co bezwzględnie stanowi istotny element rozprawy i uwiarygadnia wyciągane z eksperymentów wnioski. Przeprowadzono wnikliwą analizę statystyczną prezentowanych danych. Niektóre eksperymenty (analiza SRP, analiza MS, analiza oddziaływania LL-37 z apolipoproteina Apo A-1) zostały wykonane we współpracujących z grupą badawczą innych ośrodkach naukowych co wyraźnie zostało zaznaczone w pracy.

Całość badań stanowiących logiczny ciąg eksperymentów można podzielić na trzy etapy. Każdy etap poprzedzony jest krótkim wstępem przedstawiającym hipotezę badawczą lub/i uzasadnienie przeprowadzenia określonych eksperymentów. Pierwszy z nich to dogłębna analiza wiązania DNA z LL-37 i wyjaśnienie roli deiminacji w tym procesie. Te eksperymenty wykonano z zastosowaniem wielu wariantów LL-37 oraz zarówno bakteryjnego DNA jak i syntetycznych CpG oligonukleotydów. Po udokumentowaniu wpływu deiminacji (*in vivo* efekt działania enzymów PAD) na wiązanie DNA przez LL-37 w różnorodnych eksperymentach (różne linie komórkowe i różne strategie) analizowano wpływ procesu deiminacji peptydu na oddziaływanie z komórkami układu odpornościowego oraz stymulowane szlaki sygnalizacyjne. Udowodniono, że cytrulinacja LL-37 obniża jego potencjał immunostymulacyjny zarówno wobec komórek dendrytycznych jak i makrofagów oraz wykazano, że proces warunkowany jest obniżonym poziomem wnikania kompleksów przez błonę, co skutkuje obniżonym poziomem stymulacji receptorów TLR 9. Dane przedstawione w dwu pierwszych elementach rozprawy poza aspektem poznawczym mogą przyczynić się do „ulepszania” cech aktywności antybakteryjnej badanego peptydu. Trzeci fragment badań, w mojej opinii najciekawszy i wymagający do ich zaplanowania i wykonania głębokiej wiedzy, dotyczył roli zmian potranslacyjnych LL-37 w stymulowaniu odpowiedzi układu odpornościowego na kompleksy LL-37-DNA obecne w zewnątrzkomórkowych pułapkach neutrofilowych (NET). Struktury te wytwarzane przez aktywowane neutrofile zawierają głównie chromatynę oraz białka ziarnistości neutrofilii takie jak np. elastaza czy mieloperoksydaza. Stanowią one jeden z elementów aktywności antybakteryjnej neutrofilii. Wiadomo, że wysoki procent białek NET stanowią histony ulegające cytrulinacji. Fakt występowania w neutrofilowych pułapkach zarówno LL-37 jak i enzymów PAD odpowiedzialnych za jego potranslacyjne modyfikacje zainspirował doktorantkę do analizy wpływu tego procesu na funkcje biologiczne NET. W obszarze zainteresowań doktorantki znajdowały się zagadnienia nie aktywności antybakteryjnej a aktywność immunomodulująca NET. Zmieniony poziom przeciwciał anti-deiminowanemu peptydowi LL-37 zauważono w surowicach chorych na reumatoidalne zapalenie stawów lub paradontozę, co może wiązać proces deiminacji peptydu z rozwojem chorób autoimmunizacyjnych. NET są źródłem cytrulinowanych antygenów. Pierwszy etap badań, udokumentowanie obecności deiminowanych

form LL-37 w sieciach NET okazał się być dużym wyzwaniem. Ponieważ nie udało się udokumentować deiminacji LL-37 w strukturach NET z użyciem strategii MS zastosowano do analizy procesu kilka innych metod bezpośrednich i pośrednich (inhibitory enzymu PAD, immunofluorescencja). Dodatkowo poprzez analizę losów LL-37 w sieciach NET wyjaśniono przyczynę niepowodzeń, wykazując jak w dużym stopniu otrzymywane wyniki mogą zależeć od zastosowanej metodyki. Myślę, że determinacja doktorantki jest warta podkreślenia i docenienia. Ostatni etap badań to analiza wpływu procesu cytrulinacji LL-37 w strukturach NET na ich potencjał prozapalny. Seria doświadczeń z wykorzystaniem PMA indukowanych neutrofilii poddanych lub nie działaniu inhibitora PAD oraz dwu typów komórek układu odpornościowego wykazała bezsprzecznie, że proces citrulinacji obniża prozapalny efekt struktur NET. Z drugiej strony zmodyfikowane potranslacyjnie peptydy stymulują proces tworzenia NET. Dyskusja wyników została przeprowadzona w sposób profesjonalny w oparciu o opublikowane dane z ostatnich lat. W mojej opinii szczególnie ciekawy jest ostatni jej fragment dotyczący roli NET w indukcji chorób autoimmunizacyjnych i wpływu procesów potranslacyjnych modyfikacji LL-37 na aktywność NET i utrzymaniu odpowiedniej homeostazy dotyczącej poziomu procesów zapalnych.

Nie mam merytorycznych uwag dotyczących prezentowanych wyników.

Poproszę o wyjaśnienie dotyczące scramble LL-37. Z tym terminem spotykamy się od dosyć dawna i opisuje on źle zwinięte białka np. scRNaza.

Poproszę też o kilka informacji – które z antybakteryjnych peptydów znalazły już zastosowanie w terapiach antybakteryjnych, czy w odniesieniu do nich badano właściwości immunomodulujące? Jaka jest sugerowana droga ich podania? Jest też wiele publikacji dotyczących syntetycznych antybakteryjnych peptydów? Jakich ich cechy można w ten sposób modulować ?

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr. A. Wong spełnia wszelkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Uważam przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską mgr. A. Wong za wartościową, wzbogacającą wiedzę dotyczącą roli biologicznej peptydów antybakteryjnych i stymulacji szlaków sygnalizacyjnych komórek układu odpornościowego. Dodatkowo otrzymane dane mogą mieć znaczenie w zrozumieniu mechanizmów indukcji chorób autoimmunizacyjnych, a w konsekwencji doprowadzić do zaproponowania ewentualnych skutecznych terapii. Wnioskuje o nagrodzenie pracy stosowną nagrodą. Mgr. A. Wong jest pierwszym autorem publikacji w renomowanym czasopiśmie *Journal of Immunology*

(IF=4.539, na 155 czasopism w kategorii immunologia zajmuje ono 37 miejsce), co wskazuje na jej wiodącą rolę w powstanie tej publikacji. Co prawda w publikacji nie podano wkładu autorów w poszczególne etapy jej powstania ale porównanie danych eksperymentalnych w rozprawie doktorskiej mgr A. Wong z tymi prezentowanymi w publikacji potwierdzają wiodącą rolę doktorantki.

E. K. Jagusztyn-Krynicka

Warszawa 11.02.2019



