

Streszczenie pracy doktorskiej

Alicia Wong

Citrullination of LL-37 as a mechanism that selectively controls immunostimulatory potential of DNA

Promotor: **dr hab. Joanna Koziel**

LL-37, jedyna ludzka katelicydyna, jest amfipatycznym, kationowym peptydem bakteriobójczym, który zawiera 37 reszt aminokwasowych. Dojrzały peptyd uwalniany jest z 18 kDa białka prekursorowego (katelicydyny) przez proteazę-3 w neutrofilach lub przez proteazy serynowe z rodziny kallikrein w keratynocytach. Oprócz zdolności bezpośredniego zabijania mikroorganizmów, LL-37 pełni funkcję immunomodulacyjną. Jedną z nich jest tworzenie kompleksów z ujemnie naładowanymi oligonukleotydami pochodzącymi zarówno z obumierających komórek gospodarza, jak i patogenów. Interakcja ta ułatwia rozpoznawanie DNA przez receptory wewnątrzkomórkowe, takie jak TLR-9 prowadząc do indukcji odpowiedzi immunologicznej. W ostatnim czasie udokumentowano, że zdolność peptydu LL-37 do pełnienia funkcji bakteriobójczych i immunomodulacyjnych zależy w dużym stopniu od jego modyfikacji potranslacyjnych, wśród których deiminacja odgrywa wyjątkową rolę. Struktura pierwszorzędowa LL-37 zawiera pięć reszt argininy (Arg), które są wydajnie cytrulinowane przez deiminazy peptydylo-argininowe (PADs), enzymy, które są zależnymi od wapnia hydrolazami katalizującymi konwersję dodatnio naładowanej argininy do neutralnej cytruliny. W związku z powyższym w niniejszej pracy skupiono się na roli deiminacji peptydu LL-37 w regulacji odpowiedzi zapalnej na kwasy nukleinowe. Uzyskane wyniki dowiodły, że cytrulinacja LL-37 katalizowana przez PAD2 ogranicza zależne od peptydu pochłanianie DNA przez fagocyty. Co ciekawe, karbamyłacja peptydu (homocytrulinacja reszt lizyny) nie ma wpływu na jego interakcję z DNA, tak długo jak karbamyłowany peptyd nie zostanie poddany działaniu PAD2. W badaniach zastosowano również syntetyczny peptyd LL-37 z resztami Arg zastąpionymi homoargininą (hArg-LL-37), która jest niewrażliwa na proces enzymatycznej deiminacji przez PADy. Dane te wykazały, że wiązanie peptydu LL-37 z DNA, a tym samym jego działanie immunoregulacyjne względem fagocytów nie zależy wyłącznie od ładunku dodatniego peptydu, ale od prawidłowego rozmieszczenia guanidynowych łańcuchów bocznych argininy w natywnej sekwencji peptydu. Aby zbadać, czy powyższe zjawisko odgrywa rolę w stanie zapalnym przeprowadzono badania z wykorzystaniem

zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilowych (NETs, ang. *neutrophil extracellular traps*). Tworzenie tych struktur, zbudowanych z nici genomowego DNA udekorowanych białkami pochodzącymi z ziaren azurofilnych, w tym LL-37, zależy od aktywności PAD4. Szczegółowa analiza składu NETs i ich wpływu na profesjonalne fagocyty sugeruje, że katelicydyna/LL-37 jest cytrulinowana przez PAD4 podczas tworzenia pułapek neutrofilowych. Proces ten odgrywa istotną rolę w kontroli potencjału zapalnego NETs, zwłaszcza w regulacji odpowiedzi immunologicznej na uwolnione z obumierających komórek DNA, które jest rozpoznawane przez receptor TLR9. Przebieg procesu cytrulinacji w warunkach *in vivo* potwierdzają wyniki analizy serologicznej surowic pochodzących od pacjentów cierpiących na przewlekłe choroby zapalne, takie jak: paradontozę i reumatoidalne zapalenie stawów, w których wykazano podwyższony poziom przeciwciał rozpoznających cytrulinowaną formę peptydu LL-37. Ostatecznie, dowiedziono, że cytrulinowana forma peptydu LL-37 zwiększa powstawanie NETs, co sugeruje mechanizm pozytywnego sprzężenia zwrotnego. Podsumowując, cytrulinacja peptydu LL-37 odgrywa kluczową rolę w jego immunomodulacyjnym działaniu przeciwdziałając utracie tolerancji gospodarza na własne cząsteczki, w tym DNA.

Recenzenci:

1. prof. dr hab. Jacek Bielecki (Zakład Mikrobiologii Stosowanej: Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego)
2. prof. dr hab. med. Grażyna Młynarczyk (Katedra i Zakład Mikrobiologii: Lekarskiej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego)

05.07.2019

