Prof. dr hab. Wanda Małek
Zakład Genetyki i Mikrobiologii
Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
Ul. Akademicka 19
20-033 Lublin
e-mail wanda.malek@poczta.umcs.lublin.pl
tel: (81) 537 59 76

Lublin, 18.03.2015

Ocena rozprawy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Banaś

pt. „ Ochronna rola chemeryny w fizjologii naskórka"

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Magdaleny Banaś została wykonana w Zakładzie Immunologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie pod kierownictwem Pani prof. dr hab. Joanny Cichy. Wymieniony w tytule problem badawczy, będący przedmiotem rozprawy doktorskiej, wiąże się ściśle z tematyką badawczą projektu „TEAM", którego kierownikiem jest prof. dr hab. Joanna Cichy, a stypendystką mgr Magdalena Banaś. Ocena pracy doktorskiej została wykonana w oparciu o cykl trzech tematycznie spójnych prac oryginalnych uzupełnionych o przygotowane przez Doktorantkę streszczenie w języku polskim i angielskim, opis celów pracy i syntetyczne omówienie najważniejszych wyników na tle danych literaturowych z wnioskami w pełni, moim zdaniem, uprawnionymi. Trzy prace oryginalne będące podstawą recenzowanej rozprawy opublikowano w czasopismach z listy Filadelfijskiego Instytutu Informacji Naukowej, tj. PLOS ONE dwie prace (IF=3.534 za lata 2013/2014) i Journal of Immunology (IF=5.362 za lata 2013/2014). Przedstawione prace są współautorskie, ale w dwóch z nich Doktorantka jest pierwszym Autorem.

Podjęty przez mgr Magdalenę Banaś problem badawczy dotyczy ochronnej roli obecnej w naskórku chemeryny, a więc niedawno zidentyfikowanego, wielofunkcyjnego białka o właściwościach chemotaktycznych. Białko to reguluje migrację komórek układu immunologicznego, które na swojej powierzchni maja receptor CMKLR1 (chemokine-like receptor 1) sprzężony z białkami G. Chemeryna reguluje również rozwój komórek tłuszczowych, miocytów, osteoblastów, a także reguluje metabolizm glukozy. Za głównych producentów chemeryny uważa się wątrobę i tkankę tłuszczową. Wykazano, że jest ona również obecna w nabłonkach płuc, jelit i naskórku, które stanowią naturalne bariery ochronne organizmu. Poziom ekspresji chemeryny w tych tkankach, jej funkcja i formy w jakiej może ona występować nie były wyjaśnione do czasu podjęcia badań przez Doktorantkę

i inne osoby zespołu Pani prof. Joanny Cichy. W pracy „The expression and regulation of chemerin in the epidermis" mgr Magdalena Banaś wykorzystując metodę RT-QPCR i ELISA wykazała, że w mysiej skórze ekspresja genu *TIG2* kodującego chemerynę jest na poziomie mRNA dziesięć i sześć razy niższa w porównaniu, odpowiednio do wątroby i tkanki tłuszczowej, a na poziomie białka stężenie chemeryny jest dwa i trzy razy mniejsze, w porównaniu, odpowiednio do wątroby i tkanki tłuszczowej. Dążąc do bardziej precyzyjnego określenia, która warstwa skóry zdrowej jest głównie odpowiedzialna za syntezę chemeryny Doktorantka rozdzieliła ją na naskórek i skórę właściwą i wykazała, że to właśnie tkanka epidermalna jest głównym producentem chemeryny, a jej poziom jest porównywalny do tego występującego w wątrobie. Mając na uwadze, że chemeryna wiąże się nie tylko z receptorem CMKLR1, ale także GPR1 i CCLR2 Autorka oceniła czy poziom chemeryny regulowany jest poprzez jej wiązanie się do wspomnianych receptorów w oparciu o poziom ekspresji mRNA dla tych receptorów w skórze mysiej i ludzkiej. Uzyskane wyniki sugerują, że stężenie chemeryny zarówno w skórze mysiej jak i ludzkiej może być regulowane przez wiązanie się chemeryny do wspomnianych receptorów.

Opisane w literaturze istotne różnice w profilu ekspresji chemeryny w skórze zdrowej i skórze pacjentów cierpiących na łuszczycę, tj. chorobę o podłożu autoimmunizacyjnym zainspirowały Panią mgr Magdalenę Banaś do znalezienia odpowiedzi na pytanie czy czynniki odpowiedzialne za patofizjologię łuszczycy wpływają na syntezę chemeryny w skórze. Dążąc do jak najlepszego odwzorowania struktury naturalnego naskórka, Doktorantka zastosowała model przestrzenny 3D, który opierał się na hodowli pierwotnej ludzkich keratynocytów tworzących wielowarstwową tkankę, tzw. hodowlę organotypową. Zwróciła uwagę na istotne znaczenie warunków prowadzenia hodowli keratynocytów, na fakt, że cytokiny uwalniane przez komórki układu odpornościowego i naciekające zmienioną chorobowo skórę, w pierwszej kolejności działają na keratynocyty budujące warstwę podstawną naskórka. W związku z powyższym badane czynniki, tj. IL-17 (o kluczowej roli w rozwoju stanu zapalnego w skórze łuszczycowej) i IL-22 (związaną z nadmierną liczbą podziałów keratynocytów charakterystyczną dla łuszczycy), Doktorantka dodawała do podłoża hodowlanego, w którym umieszczane były filtry z wielowarstwową hodowlą keratynocytów. Podaniu cytokin towarzyszył spadek ekspresji genu *TIG2* podczas gdy stężenie chemeryny wydzielanej do podłoża nieznacznie spadało, ale wynik ten nie był istotny statystycznie. Łączne podanie obu cytokin pozwoliło Autorce uwiarygodnić tezę, że IL-17 i IL-22 mogą być odpowiedzialne za zmniejszoną ekspresję chemeryny w zmienionym łuszczycowo naskórku.

Na podkreślenie zasługują również badania, których celem było wyjaśnienie roli cytokin „ostrej fazy", tj. onkostatyny M (OSM) i IL-1β, których zwiększona ekspresja zachodzi w skórze ze zmianami łuszczycowymi, w ekspresji chemeryny w skórze. Obie cytokiny „ostrej fazy", szczególnie kiedy podano je razem silnie stymulowały ekspresję chemeryny w keratynocytach zarówno na poziomie mRNA jak i białka zwłaszcza po 24 godzinach działania. Ten nurt badań Doktorantka kontynuowała analizując wpływ onkostatyny M i IL-1β również na poziom ekspresji receptorów CMKLR1, CCLR2 i GPR1. Jak pisze Doktorantka, wzrost ekspresji genów kodujących wszystkie trzy receptory po 24 godzinnej stymulacji przez cytokiny ostrej fazy wskazuje, że chemeryna wydzielana przez keratynocyty może być wiązana przez receptory obecne na powierzchni komórek, a zatem może autokrynnie wpływać na ich fizjologię. Autorka, mając na uwadze fakt, że OSM i IL-1β jako czynniki „ostrej fazy" regulują procesy naprawcze w uszkodzonej tkance i zwiększają ekspresję chemeryny i jej receptorów w naskórku, słusznie sugeruje, że chemeryna i jej receptory mogą być zaangażowane w naprawę zmienionego łuszczycowo naskórka.

Wiadomo, że jednym z głównych zadań naskórka jest ochrona organizmu przed patogenami. Autorka postawiła pytanie czy mikroorganizmy infekujące naskórek wpływają na poziom ekspresji chemeryny w tej tkance. W dobrze zaplanowanych i przeprowadzonych badaniach na ludzkich keratynocytach rosnących w hodowli 3D i bezpośrednio na mysiej skórze, w których jako ewentualne stymulatory syntezy chemeryny wykorzystała *Staphylococcus aureus* szczep ATCC35556 i *Escherichia coli* HB101wykazała, że gronkowiec złocisty silniej zwiększał ekspresję chemeryny niż *E. coli* przy tym samym mianie bakterii (10^7). Autorka słusznie sugeruje, że mogło to wynikać z większej przeżywalności *S. aureus,* ale też zapewne mogło to być efektem wielu innych czynników różnicujących te dwa gatunki bakterii. Kiedy w doświadczeniu użyła bakterii hodowanych w obecności ampicyliny w stężeniu hamującym ich wzrost i miano obu gatunków bakterii było porównywalne po 24 h to wykazała, że w przypadku infekcji gronkowcem złocistym poziom mRNA genu warunkującego syntezę chemeryny jak i poziom samego białka był większy niż w przypadku infekcji *E. coli*. Doktorantka zbadała także poziom stymulacji syntezy chemeryny przez żywe i zabite temperaturą bakterie (85^oC przez 20 min) i wykazała, że żywe bakterie intensywniej stymulowały syntezę chemeryny niż zabite. Mgr Magdalena Banaś sugeruje, że czynniki klasyfikowane jako tzw. vita-PAMP (ang. viability associated pathogen-associated molecular patterns) i obecne tylko w żywych bakteriach mogą brać udział w stymulacji ekspresji chemeryny w naskórku. Mam pytanie do Doktorantki czy jakieś własne

badania, czy też innych osób z Zakładu Immunologii UJ wskazują na jakiś konkretny czynnik związany z vita-PAMP i czy ewentualnie takie badania są planowane. Moim zdaniem poza mRNA, o którym pisze Doktorantka można także rozważać udział białek komórkowych, które ulegają denaturacji i tracą swoją naturalną aktywność w wysokiej temperaturze. Autorka wykazała również pewien udział LPS-u *E. coli* w stymulacji syntezy chemeryny, który nie powinien ulegać inaktywacji w podwyższonej temperaturze przy pH obojętnym, a także czynników zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez bakterie do podłoża hodowlanego. I przy okazji drobna uwaga, pytanie czy nie bardziej właściwe od słowa medium jest określenie podłoże. Mgr Magdalena Banaś przeprowadziła również analizę immunohistochemiczną keratynocytów w hodowli 3D, które były traktowane żywymi gronkowcami złocistymi i wykazała w oparciu o preparaty z mikroskopu fluoroscencyjnego, że to warstwa podstawna naskórka syntetyzuje najwięcej chemeryny. Sugeruje także, że dzielące się keratynocyty w największym stopniu odpowiadają za poziom chemeryny uwalnianej do podłoża hodowlanego.

Wzrostowi ekspresji chemeryny w hodowli ludzkich keratynocytów zainfekowanych *S. aureus* i *E. coli* nie towarzyszył wzrost ekspresji receptorów chemerynowych po 24 h stymulacji bakteriami jakkolwiek po 48 h kontaktu keratynocytów z gronkowcem złocistym ekspresja genów kodujących receptory CMKLR1 i CCLR2 była wyraźnie zwiększona. Analogiczne badania Doktorantka przeprowadziła na mysiej skórze i potwierdziła, że keratynocyty w odmienny sposób regulują ekspresję chemeryny i jej receptorów w odpowiedzi na infekcję *S. aureus* i *E. coli.*

Za nowatorski element badań Doktorantki uważam analizę potranslacyjnych modyfikacji chemeryny występującej w ludzkim naskórku. Wyniki z tej części rozprawy doktorskiej nie zostały jeszcze opublikowane. Ludzka chemeryna, syntetyzowana jest jako prochemeryna zbudowana ze 163 aminokwasów. Po odcięciu 20 aminokwasowego peptydu sygnalnego wydzielana jest poza komórkę jako chemeryna 163S, tj. z terminalną seryną w pozycji 163. Ta biologicznie nieaktywna forma, obecna w surowicy, do uzyskania pełnej aktywności wymaga proteolitycznej modyfikacji na końcu karboksylowym przy udziale proteaz serynowych i cysteinowych. Najbardziej chemotaktycznie aktywna forma chemeryny to chemeryna 157S, krótsza o sześć aminokwasów z końca C od chemeryny 163S. Brak danych na temat form chemeryny występujących w ludzkim naskórku skłoniły Doktorantkę do podjęcia badań nad tym zagadnieniem. Materiałem badawczym był naskórek pobrany z różnych miejsc ciała, od 15 pacjentów, zarówno kobiet jak i mężczyzn w różnym wieku. Autorka nie stwierdziła różnic w identyfikowanych formach chemeryny w materiale

pochodzącym od różnych pacjentów. Stosując analizę Western Blot wykazała, że w naskórku ludzkim dominuje chemeryna o masie cząsteczkowej >70 kDa, a więc o masie znacznie większej niż masa biologicznie aktywnej chemeryny 157S (~18 kDa). Stosując tę samą technikę Autorka wykazała, że chemeryna o masie >70 kDa dominuje również w podłożu z organotypowej hodowli keratynocytów i na tej podstawie Doktorantka sugeruje, że jest to efekt tworzenia przez chemerynę kompleksów z innymi białkami. Wyniki te były impulsem do kolejnych badań, których celem było wyjaśnienie co leży u podstaw tworzenia wspomnianych kompleksów. Analiza sekwencji aminokwasowej chemeryny, w której Doktorantka stwierdziła dużo lizyn i glutamin, a także dane literaturowe o podobnej lokalizacji w naskórku chemeryny i transglutaminaz tworzących wiązania między resztami lizyny i glutaminy, nasunęły mgr Magdalenie Banaś myśl, że chemeryna może być substratem dla transglutaminaz, które wiążą dodatkowe białka w efekcie czego powstają kompleksy o dużej masie cząsteczkowej. Kompleksy te, jak sugeruje Doktorantka, mogą być oporne na proteolizę i pozbawione aktywności chemotaktycznych co w konsekwencji może zapobiegać nadmiernemu napływowi komórek układu odporności i rozwojowi stanu zapalnego. Hipotezę, że chemeryna może być substratem dla transglutaminaz Autorka potwierdziła inkubując rekombinowaną chemerynę z transglutaminazami i bez transglutaminaz, w obecności i nieobecności inhibitorów tego enzymu jak i w obecności i nieobecności podłożu z hodowli ludzkich keratynocytów. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki wskazują, że w podłożu z hodowli keratynocytów rzeczywiście mogą być obecne transglutaminazy, które katalizują wiązania między chemeryną a innymi białkami jak i między dwiema, trzema czy też czterema cząsteczkami chemeryny (na podstawie obecności produktów o masie cząsteczkowej ~40, 55 i >70 kDa). Doktorantka także pisze na stronie 21, że tworzenie agregatów chemerynowych wspomaga inne niż napływ komórek immunologicznych funkcje chemeryny w naskórku. Mam pytanie jakie dodatkowe funkcje chemeryny Doktorantka ma na myśli?.

Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że to właśnie mgr Magdalena Banaś po raz pierwszy podjęła się określenia w jakiej formie chemeryna występuje w naskórku. Jako pierwsza wykazała, że chemeryna ma zdolność wiązania się z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej jak i zdolność tworzenia chemerynowych agregatów oraz udokumentowała, że to właśnie transglutaminazy uczestniczą w tym procesie.

Kolejne ważne zagadnienie badawcze będące przedmiotem rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Banaś dotyczy funkcji chemeryny w naskórku, która nie była określona do czasu podjęcia badań przez Doktorantkę. Mając na uwadze podobieństwo strukturalne chemeryny

do katelicytydyn o właściwościach przeciwbakteryjnych i obecność chemeryny w naturalnych barierach ciała takich jak naskórek, nabłonek płuc, jelit, Doktorantka skierowała swoje badania na analizę potencjału przeciwbakteryjnego trzech różnych form chemeryny, tj. chem163S, chem157S i chem125. Wykazała, że chemotaktycznie aktywna forma chem157S i chemotaktycznie nieaktywna chem125R charakteryzują się większą aktywnością przeciwbakteryjną wobec *E. coli* i *Klebsiella pneumoniae* niż chemotaktycznie nieaktywna chemeryna 163S co nasunęło myśl Doktorantce, że różne fragmenty chemeryny mogą odpowiadać za aktywność przeciwbakteryjną i chemotaktyczną. Mam pytanie dlaczego w tym doświadczeniu zamiast *S. aureus* Doktorantka użyła *K. pneumoniae.* Na podstawie antybakteryjnej aktywności 20-aminokwasowych peptydów zsyntetyzowanych chemicznie i pokrywających całą sekwencję chemeryny 163S Autorka wytypowała peptyd 4 reprezentujący sekwencję Val^{66}-Pro^{85} jako region głównie związany działaniem przeciwbakteryjnym i wykazała, że charakteryzuje się on szerokim spektrum działania zarówno wobec bakterii Gram plus jak i Gram minus zasiedlających skórę oraz wobec *Candida albicans* wywołującego drożdżycę. Mgr Magdalena Banaś wyciągnęła słuszny wniosek, że chemeryna o aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybowej, obecna we wszystkich warstwach naskórka, może chronić go przed infekcjami przez te mikoorganizmy. Duża efektywność i szerokie spektrum działania peptydu chemerynowego p4 zarówno wobec bakterii Gram minus jak i Gram plus, a także drożdżom stały się podstawą dwóch zgłoszeń patentowych, tj. wspomnianego peptydu jak i kompozycji farmaceutycznej zawierającej peptyd p4 z możliwością ich wykorzystania do wytwarzania leku przeciw infekcjom bakteryjnym i grzybiczym oraz w leczeniu chorób związanych ze stanem zapalnym skóry, płuc i przewodu pokarmowego.

Na wyróżnienie zasługują również badania mające na celu określenie czy tak jak chemeryna rekombinowana również chemeryna wydzielana przez keratynocyty pochodzące ze zdrowej ludzkiej skóry, posiada właściwości przeciwbakteryjne. Doktorantka wykazała, że podłoże z hodowli keratynocytów działa bakteriobójczo, w tym wypadku względem *E. coli* i przeżywało 47±12% tych bakterii. Kiedy Autorka usunęła chemerynę z podłoża hodowlanego keratynocytów poprzez immunoprecypitację (wykorzystując przeciwciała królicze przeciw ludzkiej chemerynie) przeżywalność *E. coli* zwiększała się z 47±12% do 75±13%. Wykazała również, że dodanie chemeryny rekombinowanej S157 przywracało efekt bakteriobójczy i przeżywało zaledwie 22±10% bakterii. Mam dwie drobne uwagi do tej części badań. Mgr Magdalena Banaś czasami zamiast pisać, że chemeryna działa bakteriobójczo, bo takie ma dowody z badań (określa spadek liczby bakterii poprzez wysiew materiału na podłoże) pisze,

że chemeryna hamuje wzrost bakterii. I druga uwaga, a w zasadzie pytanie, dlaczego w tym doświadczeniu nie wykorzystała także *S. aureus* jako przedstawiciela bakterii Gram dodatnich.

Pięknym zwieńczeniem przeprowadzonych przez mgr Magdalenę Banaś badań, których wyniki były ostatecznym i jednoznacznym dowodem, że chemeryna syntetyzowana w naskórku działa bakteriobójczo było doświadczenie na myszach z wyciszonym genem *Tig2* kodującym chemerynę. Przeżywalność *S. aureus* na skórze mysz z deficytem chemeryny była przynajmniej 10 razy większa w porównaniu ze skórą mysz typu dzikiego.

Cele pracy mgr Magdalena Banaś przedstawiła dokładnie i jednoznacznie. W rozdziale tym Doktorantka opisała nie tylko cele przeprowadzonych badań, ale także wskazała argumenty przemawiające za takim, a nie innym wyborem obiektu badań.

Studiując rozprawę doktorską mgr Magdaleny Banaś nasunęło mi się jeszcze kilka innych uwag i pytań do Autorki niż wcześniej wymienione:

- W wielu miejscach użyto określenia szczep np. *S. aureus* bez podania o jaki szczep rzeczywiście chodzi, podobnie na str. 23 użyto określenia szczepy kolonizujące skórę np. *Pseudomonas, Stapholococcus* itd., a powinno się napisać nazwę gatunkową i numer szczepu, a nie tylko nazwę rodzajową;
- Kiedy po raz pierwszy piszemy nazwę gatunkowa bakterii to zapisujemy ją w pełnym jej brzmieniu, tj. podajemy pełną nazwę rodzajową, a nie tylko pierwszą literę i epitet opisujący gatunek np. *Stapholococcus aureus*;
- Str. 19 użyto terminu odporność (białka) na uszkodzenie mechaniczne, czy jednak w tym przypadku nie powinno się mówić o oporności;
- I ostatnie pytanie, czy te bardzo interesujące badania związane z chemeryną obecną w naskórku są kontynuowane przez mgr Magdalenę Banaś i zespół Pani Prof. Joanny Cichy.

Przedstawione powyżej drobne uwagi, które mają charakter dyskusyjny lub redakcyjny w niczym nie umniejszają merytorycznej wartości pracy, którą oceniam bardzo wysoko.

Wniosek końcowy

Biorąc pod uwagę przedstawione dane dotyczące formalnej i merytorycznej oceny pracy doktorskiej mgr Magdaleny Banaś stwierdzam, że rozprawa stanowi oryginalne osiągnięcie naukowe. Wnosi ona nowe dane do nauki i ma znaczenie nie tylko poznawcze, ale także aplikacyjne czego dowodem są dwa zgłoszenia patentowe do Polskiego i Europejskiego Biura Patentowego. W niniejszej pracy po raz pierwszy określono formy w jakich chemeryna występuje w naskórku. Autorka wykazała się bardzo dobrą znajomością tematu,

umiejętnością prawidłowego wykorzystania nowoczesnych metod badawczych, ogromną konsekwencją w realizacji założonych celów, a także oryginalnością w formułowaniu i rozwiazywaniu stawianych sobie zadań oraz prawidłowością formułowania wniosków.

W świetle przedstawionych wyżej danych stwierdzam, że praca doktorska mgr Magdaleny Banaś wykonana w Zakładzie Immunologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierownictwem prof. dr hab. Joanny Cichy spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim. W związku z powyższym wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Magdaleny Banaś do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto ze względu na wysoki poziom merytoryczny ocenianej rozprawy oraz fakt opublikowania większości wyników w trzech artykułach, które ukazały się w międzynarodowych czasopismach o zasięgu międzynarodowym i wysokim współczynniku oddziaływania (Impact Factor), wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej stosowną nagrodą.

prof. dr hab. Wanda Małek