ZAŁĄCZNIK 3A

AUTOREFERAT

Informacje o dorobku i osiągnięciach naukowych

Karbamylacja jako modulatror odpowiedzi immunologicznej

Piotr Mydel MD PhD

Department of Clinical Science

University of Bergen

1. Imię i Nazwisko

Piotr Mydel

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

2.a. Tytuł Lekarza Medycyny

- Data uzyskania: 2 sierpnia 1999r.
- Miejsce realizacji pracy: Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków, Polska
- Jednostka przyznająca: Uniwersytet Jagielloński, Kraków, Polska
- Dyplom: 1795/140/99 (**Załącznik 1**).

2.b. Tytuł doktora

- Data uzyskania: 1 grudnia 2006r.
- Tytuł pracy: The host oxidative immune response and bacterial antioxidant protein, ruberythrin in virulence of *Prorphyromonas gingivalis*.
- Miejsce realizacji pracy: Zakład Mikrobiologii, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków, Polska.
  Promotorzy: Prof. dr. hab. J. Potempa i Prof. A. Tarkowski, Recenzenci: Prof. W. Rudnicka i Prof. H. Rokita).
- Jednostka przyznająca: Uniwersytet Jagielloński, Kraków, Polska
- Dyplom: DO-4013/2879/09 (**Załącznik 1**).

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

Okres czasu	Stanowisko	Jednostka
2015-do chwili obecnej	Associate Professor	Department of Clinical Science, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Bergen, Bergen, Norway

2011-2015	Postdoctoral Fellow	Department of Clinical Science, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Bergen, Bergen, Norway
2008-2011	Forskare	Department of Rheumatology and Inflammation Research, Faculty of Medicine, Goteborg University, Goteborg, Sweden
2006 –2008	Postdoctoral Fellow	Department of Internal Medicine, Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Washington University School of Medicine at Washington University Medical center, St.Louis, MO, USA

4. PUBLIKACJE NAUKOWE STANOWIĄCE PODSTAWĘ ZŁOŻENIA ROZPRAWY HABILITACYJNEJ

4.a. Tytuł osiągnięcia naukowego

Karbamylacja jako modulator odpowiedzi immunologicznej.

4.b. Publikacje naukowe

1. **Mydel P**, Wang Z, Brisslert M, Hellvard A, Dahlberg L, Hazen SL, Bokarewa M (2010) "Carbamylation-dependent activation of T cells: a novel mechanism in pathogenesis of autoimmune arthritis". *J Immunol.* 184(12):6882-90, doi: 10.4049/jimmunol.1000075.
2. Koro C, Bielecka E, Dahl-Knudsen A, Enghild J, Scavenius C, Brun G, Binder V, Hellvard A, Bergum B, Jonsson R, Potempa J, Blom A, **Mydel P** (2014) "Carbamylation of immunoglobulin abrogates the classical pathway of complement activation" *EurJ Immunol* Eur 2014 Nov;44(11):3403-12. doi: 10.1002/eji.201444869.
3. Bergum B, Koro C, Delaleu N, Solheim M, Hellvard A, Binder V, Jonsson R, Valim V, Hammenfors DS, Jonsson MV, **Mydel P** (2015) "Antibodies against carbamylated proteins are present in primary Sjögren's syndrome and are associated with disease severity" *Ann Rheum Dis.* doi: 10.1136/annrheumdis -2015-20775.
4. Koro C, Hellvard A, Delaleu N, Binder V, Scavenius C, Bergum B, Glowczyk I, Roberts H, Chapple ILC, Grant MM, Rapala-Kozik M, Klaga K, Enghild J, Potempa

J, **Mydel P** (2016) "Carbamylated LL-37 as a Modulator of the Immune Response" *Innate Immunity doi: 10.1177/1753425916631404*

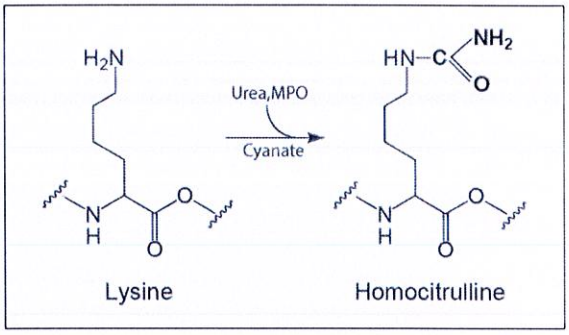
4.c. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

W niniejszej części przedstawione zostaną główne tezy oraz wyniki badań stanowiące podstawę pracy habilitacyjnej „Karbamylacja jako modulator odpowiedzi immunologicznej". Pełna lista naukowych osiągnięć została zaprezentowana w Załączniku 2 (zawierającym wykaz wszystkich opublikowanych prac naukowych oraz informacje o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej oraz popularyzacji nauki).

4.c.1. Wstęp

Modyfikacje posttranslacyjne (ang. post-translational modifications – PTMs) są kluczowym etapem dojrzewania białek. PTMs zwiększają funkcjonalną różnorodność proteomu i odgrywają fundamentalną rolę w rozmaitych procesach komórkowych takich jak: oddziaływanie białko-białko, przekaz wewnątrzkomórkowy, różnicowanie komórek czy regulacja ekspresji genów[1,2]. Karbamylacja jest powszechnie zachodzącą, nieenzymatyczną modyfikacją posttranslacyjną, w której jony cyjanianowe (OCN^-) reagując z pierwszorzędowymi grupami aminowymi (NH_3^+) reszt aminokwasowych na N-końcu łańcuchów białkowych lub z grupami bocznymi lizyny znajdującymi się wewnątrz łańcucha peptydowego, powodują tworzenie odpowiednio α-karbamylowanych aminokwasów lub ε-karbamylo-lizyny (homocytruliny)[3,4]. Pomimo, iż stężenie mocznika (produktu ubocznego metabolizmu białek) i cyjanianu pozostają w organizmie w równowadze (oscylując w stosunku molowym ~ 1:200)[5], od lat odnotowuje się znacząco zwiększony poziom liczby białek karbamylowanych w schorzeniach związanych z przewlekłą chorobą nerek (uremią). Dla wyjaśnienia tej obserwacji sugeruje się istnienie powiązania pomiędzy obecnością stanu zapalnego, aktywnością enzymu mieloperoksydazy (MPO) i zachodzeniem procesu karbamylacji. MPO, peroksydaza hemowa uwalniana przez zaktywowane neutrofile, katalizuje reakcję tworzenia jonów cyjanianowych z nadtlenku wodoru i tiocyjanianu, których obecność ostatecznie prowadzi do homocytrulinacji białek. W związku z powyższymi doniesieniami, aktualnie uwaga badaczy skupia się na potwierdzeniu roli mieloperoksydazy jako potencjalnego czynnika indukującego powstawanie stanu zapalnego i zmian miażdżycowych. Aminokwas lizyna posiada dodatnio naładowany łańcuch boczny, który w

[1] Kraus et al. (2001) *Carbamoylation of amino acids and proteins in uremia.* Kidney Int Suppl, 78: S102-7.
[2] Mannet al. (1991) *Phosphorylation of alpha-crystallin B in Alexander's disease brain.* FEBS Lett, 294: 133-6
[3] Stark et al. (1963) The use of cyanate for the determination of NH2-terminal residues in proteins. J Biol Chem 238:214–226
[4] Wang et al. (2007) *Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis.* Nat Med. 13(10):1176-84
[5] Claxton et al. (2013) "Endogenous carbamylation of renal medullary proteins," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 12, Article ID e82655



procesie karbamylacji (podobnie jak reszta argininy w wypadku cytrulinacji) traci ładunek w wyniku powstawania obojętnie naładowanej homocytuliny (Hcit). Ta modyfikacja może wpływać na dystrybucję całkowitego ładunku powierzchniowego polipeptydu, powodując zmianę lub całkowitą utratę funkcji zmodyfikowanego białka. Utrata aktywności biologicznej spowodowana karbamylacją została udowodniona dla takich białek jak: metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 2, tkankowy inhibitor metaloproteinazy-2 i insulina [6,7]. Powszechna obecność mieloperoksydazy w ogniskach zapalnych wywołuje duże zainteresowanie rolą procesu karbamylacji w kontekście chorób charakteryzujących się występowaniem przewlekłego stanu zapalnego i zmian miażdżycowych. Poza bezpośrednim wpływem karbamylacji na funkcję i metabolizm białek, reszty homocytruliny mogą stanowić neo-epitopy wywołujące pierwotną odpowiedź immunologiczną, powodując tym samym zwiększoną migrację i proliferację limfocytów T CD4+ i produkcję cytokin INF-γ, IL-10 i IL17. Dodatkowo obecność przeciwciał skierowanych przeciwko białkom karbamylowanym (anty-CarP) stanowi istotny kliniczny wskaźnik pozwalający na przewidzenie zaostrzonego przebiegu reumatoidalnego zapaleniu stawów.

Co więcej stwierdza się, iż karbamylacja jest potencjalnie szkodliwym czynnikiem w patogenezie takich schorzeń jak niewydolność nerek (prowadzącym do akumulacji we krwi cyjanianów pochodzących z metabolizmu mocznika) [8], chorobach układu krążenia[4] i zaćmie[9]. Ostatnie badania pokazują również bezpośrednią korelację pomiędzy poziomem karbamylacji albuminy w surowicy krwi i rokowaniami pacjentów w końcowych stadiach choroby nerek[10]. Z kolei homocytrulinacja białek macierzy zewnątrzkomórkowej, takich jak kolagen czy fibrynogen, ze względu na ich długi okres półtrwania i powolny metabolizm, powoduje akumulację uszkodzeń w ich strukturze i odgrywa znaczącą rolę w patogenezie zmian nowotworowych?

Wszystkie powyższe doniesienia sugerują, że proces karbamylacji może stanowić istotny czynnik w rozwoju różnych chorób o podłożu zapalnym, ale szczególnie interesujące wydaje się ono w kontekście rozwoju reumatoidalnego zapalenia stawów (RA), w którym jednym z głównych stwierdzonych czynników etiologicznych jest palenie tytoniu. Ze

---

[6] Kraus et al. (2001) *Carbamoylation of glomerular and tubular proteins in patients with kidney failure: a potential mechanism of ongoing renal damage*. Swiss Med Wkly. 131(11-12):139-4

[7] Oimomi et al. (1987) *Carbamylation of insulin and its biological activity.* Nephron. 1987;46(1):63-6

[8] Balion et al. (1985) *Carbamylated hemoglobin and carbamylated plasma protein in hemodialyzed patients*. Kidney Int. 1998;53(2):488-95

[9] Beswick et al. (1984) *Conformational changes induced in bovine lens alpha-crystallin by carbamylation. Relevance to cataract*. Biochem J. 1984;223(1):221-7

[10] Berg et al. (2014) *Carbamylation of serum albumin as a risk factor for mortality in patients with kidney failure*. Sci Transl Med. 2013 Mar 6; 5(175): 175ra29.

względu na to, że palenie jest dodatkowym źródłem cyjanianów w organizmie i niezaprzeczalnie czynnikiem ryzyka w rozwoju RA, wysoce prawdopodobne wydaje się, iż to właśnie proces karbamylacji białek bierze udział w wywoływaniu tej choroby i obserwowanym w jej przebiegu procesie przełamania tolerancji immunologicznej. Najnowsze badania pokazują, że u ponad połowy pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów wykrywane są autoprzeciwciała specyficzne wobec białek/reszt karbamylowanych, które nie wykazują krzyżowej reaktywności z białkami cytrulinowanymi i *vice versa* – autoprzeciwciała przeciwko białkom cytrulinowanym (ACPAs) nie wykazują kros-reaktywności z białkami karbamylowanymi. Wskazuje to na przynależność tych dwóch rodzajów przeciwciał (anty-CarP i ACPAs) do oddzielnych rodzin rozpoznających odmienne immunogeniczne epitopy. Jednak obecność przeciwciał anty-CarP również stanowi wskaźnik gorszych rokowań w postępie reumatoidalnego zapalenia stawów (obok autoprzeciwciał ACPA i RF – czynnik reumatoidalny).

Poznawanie roli karbamylacji i obecności autoprzeciwciał skierowanych przeciwko produktom tej modyfikacji z pewnością poszerza naszą wiedzę, ale stawia przed badaczami kolejne pytania, gdyż ujawnia jak bardzo niedoceniana jest rola modyfikacji posttranslacyjnej białek w etiologi (przewlekłych) chorób o podłożu zapalnym. Dlatego też głównym celem niniejszej pracy jest zdefiniowanie patogennego znaczenia karbamylacji i przeciwciał anti-CarP oraz ustalenie czy stanowią one dobry cel diagnostyczny i terapeutyczny w prewencji i leczeniu chorób zapalnych.

Poniżej przedstawiono wyniki pokazujące wpływ karbamylacji białek/peptydów na powstawanie odpowiedzi immunologicznej oraz potencjalne zastosowanie przeciwciał anti-CarP jako nowego biomarkera w chorobach autoimmunologicznych. W rozdziale **4.c.2** opisano znaczenie immunogenności karbamylowanych adduktów w wywoływaniu i postępie RA, oraz po raz pierwszy przedstawiono przypuszczalny mechanizm łączący procesy cytrulinacji i karbamylacji w etiopatologii zapalenia stawów. W rozdziale **4.c.3** dostarczono dowodów na występowanie karbamylowanych reszt lizyny w specyficznych miejscach łańcucha polipeptydowego przeciwciał klasy IgG_1 - najpowszechniej występującym w krwioobiegu izotypie przeciwciał – ulegających modyfikacji w warunkach występowania stanu zapalnego zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. Stwierdzono, iż konsekwencją tej zmiany jest obniżenie zdolności immunoglobulin do aktywacji układu dopełniacza. Dodatkowo zauważono, że karbamylacja selektywnie hamuje zależną od przeciwciał cytotoksyczność Rituximabu (biologiczny preparat stosowanego w leczeniu chorób autoimmunologicznych). W rozdziale **4.c.4** zaprezentowano wyniki udowadniające obecność i prognostyczną wartość przeciwciał przeciwko białkom karbamylowanym (anti-CarP) w surowicy pacjentów cierpiących na pierwotny Zespół Sjögren'a, dające nowe możliwości identyfikacji pacjentów, u których dochodzi do zaostrzenia przebiegu choroby i zwiększonego ryzyka rozwoju schorzeń współistniejących. Na koniec w rozdziale **4.c.5** opisano wpływ karbamylacji na biologiczną aktywność jedynej ludzkiej katelicydyny - peptydu LL-37. Modyfikacja tego

bogatego w lizyny peptydu, w ośrodku zapalnym ma głęboki wpływ na jego funkcje bakteriobójcze i immunomodulacyjne. Odkrycia te mają istotne znaczenie w kontekście klinicznych zastosowań peptydu u pacjentów z objawami sepsy.

4.c.2. Carbamylaton-dependent activation of T cells: a novel mechanism in pathogenesis of autoimmune arthritis". *Journal of Immunology,* 184(12):6882-90

Główne osiągnięcia:

- Udowodnienie komplementarnego efektu zachodzenia procesów cytrulinacji i karbamylacji białek w rozwoju zapalenia stawów.
- Wskazanie nowego mechanizmu w patogenezie autoimmunologicznego zapalenia stawów.
- Ocena wpływu karbamylacji białek na wywołanie odpowiedzi immunologicznej.
- Opracowanie metody umożliwiającej wykrywanie przeciwciał anty-CarP opartej o test ELISA

Przełomowe odkrycie jakim było stwierdzenie obecności przeciwciał przeciwko białkom cytrulinowanym w surowicy większości pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów (RA)[11], doprowadziło do znaczącego postępu w zrozumieniu mechanizmu powstawania RA i opiece klinicznej nad pacjentami. 12 lat po tym wydarzeniu zidentyfikowaliśmy rolę procesu karbamylacji białek jako drugiej modyfikacji posttranslacyjnej, będącej celem odpowiedzi autoimmunologicznej organizmu, sprzyjającej powstawaniu i rozwojowi RA. Nowe grupy autoprzeciwciał odkrywane w związku z badaniami nad reumatoidalnym zapaleniem stawów, są zwykle związane z białkami naznaczonymi posttranslacyjnymi modyfikacjami, a ukierunkowanie odpowiedzi systemu immunologicznego na produkty tych pozornie niepowiązanych PTMs może powiedzieć nam więcej na temat mechanizmów leżących u podstaw tej choroby. W niniejszej części pracy pokazano, iż karbamylacja reszt lizyny może być brakującym ogniwem w procesie patogenezy autoimmunologicznego zapalenia stawów. Immunizacja myszy przy pomocy karbamylowanych peptydów (immunizacja Hcit) powoduje aktywację limfocytów T i B, a w konsekwencji zwiększony poziom proliferacji komórek, produkcji cytokin i autoprzeciwciał. Wyniki te wyraźnie wskazują, że karbamylacja zmienia immunologicznie obojętne peptydy w auto-antygeny. Co bardziej istotne myszy immunizowane karbamylowanymi peptydami stają się podatne na rozwój zapalenia stawów wywołany przez bezpośrednią aplikację peptydów cytrulinowanych do stawów kolanowych.

Badanie patogennego znaczenia karbamylowanych peptydów w mysim modelu zapalenia stawów pokazało, że podanie wcześniej nieimmunizowanym zwierzętom peptydów

---

[11] Schellekens et al. (1998) *Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognised by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies*.J Clin Invest ;101:273–81.

HCit powoduje wywołanie u nich umiarkowanego stanu zapalnego w stawach, podczas gdy takiego efektu nie obserwowano w wypadku podania peptydów cytrulinowanych. Zaskakująco, podanie cytrulinowanych peptydów bezpośrednio do stawów kolanowych myszy immunizowanym wcześniej peptydami HCit skutkowało zwiększonym wskaźnikiem powstawania stanu zapalnego oraz silną erozją tkanek. Immunizacja peptydami HCit, po której zwierzętom podawano cytrulinowane peptydy wywoływała ostrą erozję zapalną w przypadku ponad 90% myszy. Efekt taki nie występował w przypadku myszy immunizowanych cytrulinowanymi peptydami, po którym również nastrzykiwano do stawów cytrulinowane białka. Predyspozycja do rozwijania stanu zapalnego w stawach w przedstawionym modelu u myszy immunizowanych peptydami HCit, była niezależna od struktury karbamylowanych peptydów (liniowej czy cyklicznej), co dodatkowo potwierdza rolę karbamylacji w wywoływaniu tej choroby.

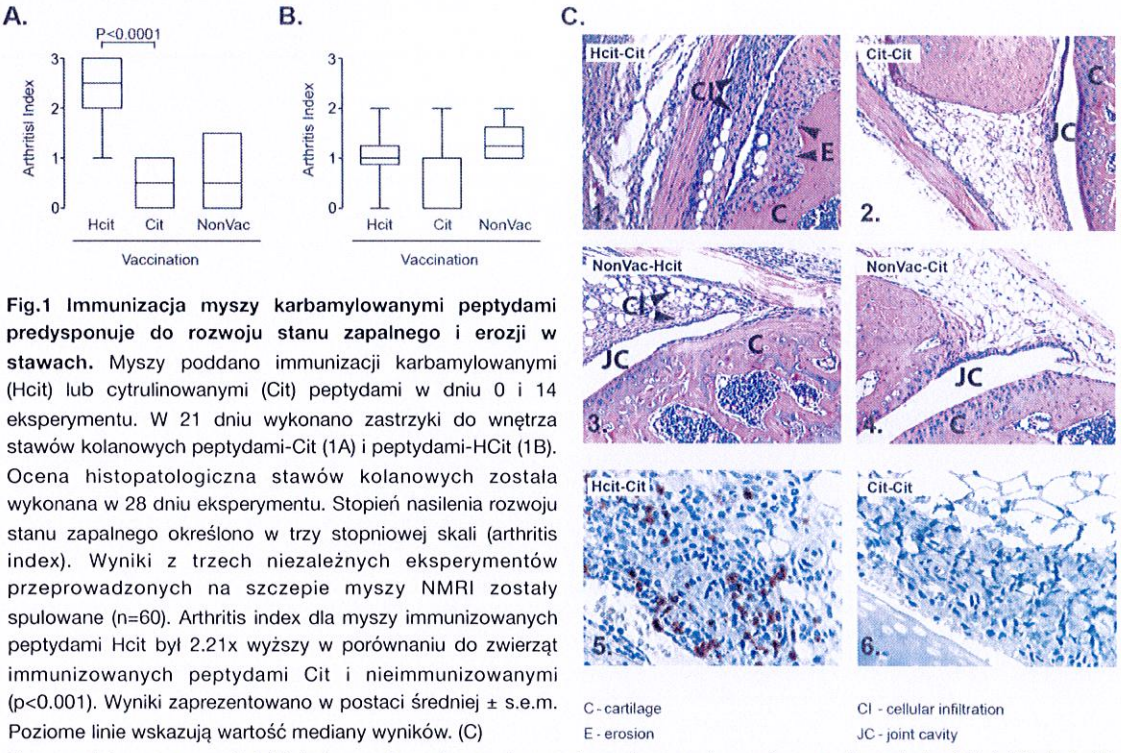


Fig.1 Immunizacja myszy karbamylowanymi peptydami predysponuje do rozwoju stanu zapalnego i erozji w stawach. Myszy poddano immunizacji karbamylowanymi (Hcit) lub cytrulinowanymi (Cit) peptydami w dniu 0 i 14 eksperymentu. W 21 dniu wykonano zastrzyki do wnętrza stawów kolanowych peptydami-Cit (1A) i peptydami-HCit (1B). Ocena histopatologiczna stawów kolanowych została wykonana w 28 dniu eksperymentu. Stopień nasilenia rozwoju stanu zapalnego określono w trzy stopniowej skali (arthritis index). Wyniki z trzech niezależnych eksperymentów przeprowadzonych na szczepie myszy NMRI zostały spulowane (n=60). Arthritis index dla myszy immunizowanych peptydami Hcit był 2.21x wyższy w porównaniu do zwierząt immunizowanych peptydami Cit i nieimmunizowanymi ($p<0.001$). Wyniki zaprezentowano w postaci średniej ± s.e.m. Poziome linie wskazują wartość mediany wyników. (C) Reprezentatywne preparaty histologiczne obrazujące zmiany w stawach myszy immunizowanych peptydami Hcit ($1C_1$) lub Cit ($1C_2$), którym podano następnie do stawów peptydy cytrulinowane. Kontrola nieimmunizowana ($1C_{3,4}$). Doświadczenia z indukcją stanu zapalnego w stawach zostały powtórzone w pięciu niezależnych eksperymentach z użyciem w trzech dzikich szczepach myszy (NMRI, BALB/c, Asn)(n=126), w 92% przypadków zaobserwowano rozwój zapalenia stawów. Barwienia immunologiczne próbek tkanek myszy immunizowanych peptydami Hcit lub Cit zostały przeprowadzone z użyciem szczurzych przeciwciała anty-mysiemu CD3. Wysoka liczba komórek CD3+ (brązowe barwienie) została zaobserwowana w błonie maziowej stawów kolanowych myszy immunizowanych peptydami Hcit ($1C_5$) w porównaniu z myszami immunizoawnymi peptydami Cit ($1C_6$). *Mydel et.al., (2010) JImmunol,184(12):6882-9. Copyright 2010. The American Association of Immunologists, Inc.*

Używany przez nas model indukcji zapalenia stawów wykazuje wyraźną zależność od rodzaju białek MHC klasy II biorących udział w prezentacji karbamylowanych antygenów. Szczep myszy BALB/c (haplotyp H2-A^d) przejawiał tendencję do wykazywania bardzo silnej

reakcji na podawane antygeny, podczas gdy u myszy szczepu C57BL/6 (haplotyp H2-A^b) nie zaobserwowano objawów rozwoju schorzenia. Silna zależność pomiędzy rozwojem zapalenia stawów wywołanego obecnością białek karbamylowanych i rodzajem kompleksu MHC klasy II biorącego udział w odpowiedzi immunologicznej, podkreśla znaczenie kliniczne naszego modelu dla badania reumatoidalnego zapalenia stawów u ludzi, ponieważ podatność na tę chorobę w populacji ludzkiej jest silnie skorelowana z haplotypem HLA-DRB1[12].

Dodatkowo nasze wyniki dostarczają dowodu na kluczową rolę uwrażliwiania limfocytów T karbamylowanymi przeciwciałami w etiologii zapalenia stawów, wywołanego obecnością cytrulinowanych białek. Immunobarwienia tkanek stawów myszy, immunizowanych peptydami Hcit, eksponowanych następnie na cytrulinowane peptydy, ujawniły obecność wysokiej liczby komórek CD3+ pozytywnych. U myszy immunizowanych peptydami Cit nie zaobserwowano infiltracji błony maziowej stawów kolanowych przez limfocyty T.

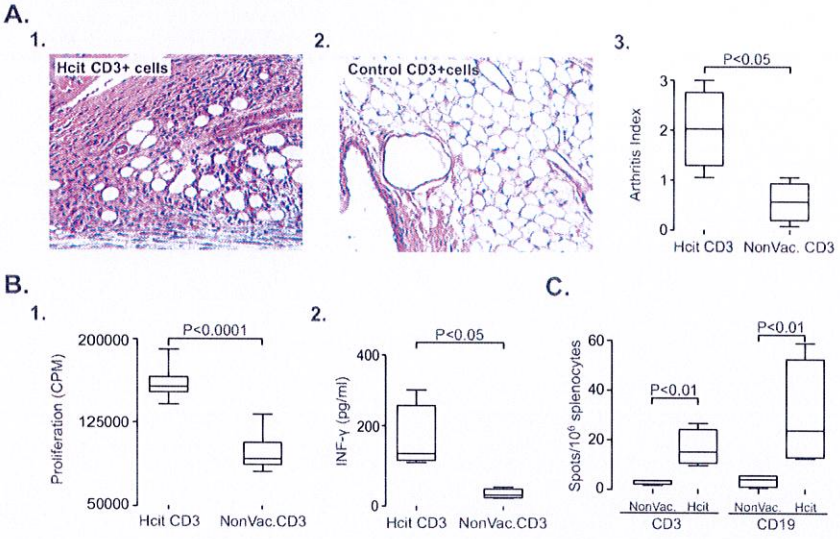


Fig.2 Limfocyty T i B pochodzące z myszy immunizowanych karbamylowanymi peptydami predysponują do rozwoju zapalenia stawów indukowanego obecnością cytrulinowanych białek. Komórki CD3+ i CD19+ zostały wyizolowane poprzez negatywną selekcję ze śledziony myszy szczepu BALB/c immunizowanych karbamylowanymi peptydami i podane dożylnie naiwnym myszom (BALB/c) w dawce 5x106 komórek/mysz (n=10). Kontrolne myszy BALB/c otrzymały taką samą liczbę komórek CD3+ lub CD19+ wyizolowanych z nieimmunizowanych myszy BALB/c (n=10). W 12 dniu po transferze limfocytów wszystkim myszom podano do stawów dawkę peptydów cytrulinowanych. (A) Ocena histopatologiczna stawów kolanowych 7 dni później wskazuje na wykształecnie ciężkiego stanu zapalnego w stawach u 100% biorców komórek CD3+ pochodzących od myszy immunizowanych peptydami Hcit (arthritis score 2.19 ±0.54) (A1,3),podczas gdy tylko u dwóch myszy będących biorcami naiwnych komórek CD3+ stwierdzono obecność słabego stanu zapalnego (AI 0.4+/-0.41, p=0.003) (A2,3). Myszy-biorcy komórek CD3+ od immunizowanych peptydami Hcit dawców wykazywały dodatkowo zwiększoną proliferację limfocytów T (p<0.0001)(B1) oraz podniesiony poziom produkcji INF-gamma w porównaniu z kontrolą (B2). (C) U myszy-biorców komórek CD3+ jak i CD19+ z dawców immunizowanych peptydami-HCit stwierdzono znacznie wyższe poziomy przeciwciał specyficznych przeciwko peptydom karbamylowanym. Pomiaru dokonano z użyciem ELISPOT. Wyniki zaprezentowano w postaci średniej ± s.e.m. Poziome linie reprezentują medianę wyników. *Mydel et.al.*, (2010) *JImmunol*, 184(12):6882-90. Copyright 2010. The American Association of Immunologists, Inc.

Aby potwierdzić rolę limfocytów T w rozwoju choroby, zastosowano transfer tych komórek z myszy immunizowanych peptydami HCit do myszy BALB/c nie poddanych wcześniejszej

---

[12] Klareskoget al. (2006) *A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. Arthritis Rheum.* **54**: 38–46

immunizacji. Wyniki konsekwentnie pokazują, że zwierzęta którym zaaplikowano limfocyty T CD3+ (pochodzące od myszy immunizowanych peptydami Hcit) charakteryzowały się wyższym poziomem „indeksu zapalnego" (punktowa ocena zmian klinicznych obserwowanych u myszy w wyniku wywołanego zapalenia stawów), niż te które otrzymały limfocyty CD3+ od dawców nieimmunizowanych. Zgodnie z wynikami histologicznymi u myszy biorców komórek CD3+, pochodzących od zwierząt immunizowanych peptydami Hcit, obserwowano zwiększoną proliferację komórek T oraz produkcję IFN-γ, naśladujące charakterystyczny fenotyp myszy bezpośrednio immunizowanych peptydami Hcit.

Nasze wyniki świadczą również o większym znaczeniu peptydów cytrulinowanych, niż samych przeciwciał skierowanych przeciwko białkom cytrulinowanym w patogenezie zapalenia stawów. Peptydy Cit stanowią silny czynnik wywołujący stan zapalny w stawach zwierząt wcześniej eksponowanych na obecność białek/peptydów zawierających karbamylowane reszty lizyny (peptydy Hcit). Pokazano, że podanie do stawów "naiwnych" myszy peptydów cytrulinowanych nie jest wystarczające do wywołania stanu zapalnego, a wcześniejsza immunizacja zwierząt peptydami cytrulinowanymi daje tylko niewielką odpowiedź przeciwciał, co stoi w zgodzie z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi[13]. A zatem nasze dane doświadczalne wskazują na rolę karbamylacji reszt lizyny w peptydach, jako czynnika wywołującego reakcję łańcuchową, której rezultatem jest wzmożona wrażliwość na cytrulinowane peptydy w miejscu ich akumulacji.

Aby przetestować naszą hipotezę, występowanie takiej sekwencji zdarzeń skonfrontowano z przebiegiem reumatoidalnego zapalenia stawów u ludzi. Na początku w próbkach krwi oraz płynu maziowego pochodzących od pacjentów z RA przeprowadzono ocenę ilości karbamylowanych oraz cytrulinowanych reszt, a także poziomu specyficznych przeciwciał IgG przeciwko tym posttranslacyjnym modyfikacjom. U badanych stwierdzono występowanie podniesionych poziomów zarówno homocytruliny jak i cytruliny, których ilość dodatkowo skorelowana była z zaostrzonym przebiegiem choroby. Chociaż poziom peptydów cytrulinowanych był wysoki już w samej krwi pacjentów z RA, to dodatkowo dochodziło do ich akumulacji lokalnie w płynie maziowym stawów. Co zaskakujące odnotowana duża ilość białek cytrulinowanych nie była jednak związana z poziomem przeciwciał anty-Cit u pacjentów, podczas gdy poziom przeciwciał anty-Hcit był zwiększony u pacjentów charakteryzujących się zaostrzonym przebiegiem choroby.

Podsumowując nasza praca dobitnie pokazuje, iż karbamylowane białka posiadają zdolność do wywołania pierwotnej odpowiedzi immunologicznej, indukcji chemotaksji i proliferacji limfocytów CD4+, a w następstwie produkcję cytokin : IFN-γ, IL-10 i -17. Aktywacja limfocytów T, w kombinacji z silną odpowiedzią z wykorzystaniem przeciwciał, prowadzi do lokalnego rozpoznania cytrulinowanych peptydów w stawach i ostatecznie do rozwoju silnie niszczącego stanu zapalnego. W przytoczonych powyżej badaniach porównano

---

[13] Lundberg et al. (2005) *Citrullinated proteins have increased immunogenicity and arthritogenicity and their presence in arthritic joints correlates with disease severity. Arthritis Res. Ther.* 7: R458–R467.

efekt występowania dwóch rodzajów modyfikacji posttranslacyjnych białek – karbamylacji i cytrulinacji – oraz zaobserwowano ich odmienny wpływ na aktywację limfocytów T, indukcję produkcji cytokin oraz przeciwciał. Pomimo różnic funkcjonalnych, peptydy powstające w trakcie zachodzenia wspomnianych modyfikacji posttranslacyjnych wykazują uzupełniający wobec siebie efekt - immunoaktywacyjny potencjał produktów karbamylacji wzmacnia prozapalne właściwości peptydów cytrulinowanych w rozwoju zapalenia stawów. Tym samym po raz pierwszy pokazaliśmy komplementarny efekt działania posttranslacyjnie zmodyfikowanych peptydów i zasugerowaliśmy nowy mechanizm patogenezy autoimmunologicznego zapalenia stawów.

Potencjalne wykorzystanie:

- Uzyskane dane pozwalają lepiej zrozumieć procesy prowadzące do rozwoju reumatoidalnego zapalenia stawów.
- W przyszłości uzyskane wyniki mogą stanowić obiecującą podstawę do projektowania nowych metod zapobiegania rozwojowi i leczenia chorób zapalnych.
- Uzyskane wyniki pozwoliły na opracowanie nowego testu diagnostycznego.

4.c.3. "Carbamylation of immunoglobulin abrogates activation of the classical complement pathway". *European Journal of Immunology*,44(11):3403-12

Główne osiągnięcia:

- Ocena wzoru karbamylacji ludzkich przeciwciał klasy IgG_1 powstających w warunkach stanu zapalnego
- Zbadanie wpływu karbamylacji przeciwciał klasy IgG_1 na aktywację klasycznej drogi układu dopełniacza
- Scharakteryzowanie, nie opisanej wcześniej, kluczowej roli konkretnych reszt lizyny w przeciwciałach klasy IgG_1 odpowiadających za oddziaływanie z białkiem C1q układu dopełniacza.

Przeciwciała klasy IgG są najliczniej reprezentowanym izotypem przeciwciał krążących w ludzkiej krwi obwodowej, stanowiącym prawie 75% całkowitej liczby immunoglobulin w surowicy. Odgrywają one kluczową rolę w obszarze występowania stanu zapalnego dzięki zdolności do rozpoznawania (przez fragment Fab przeciwciała) patogenów atakujących ludzki organizm, a po związaniu z bakteryjnym antygenem do uruchomienia kaskady układu dopełniacza (poprzez fragment Fc przeciwciała). Produktami aktywacji układu komplementu jest szereg białek spełniających funkcję m.in. chemoatraktantów dla komórek układu immunologicznego, opsonin, mediatorów prozapalnych oraz białek bezpośrednio prowadzących do zabicia patogenów poprzez tworzenie MAC (membrane attack complex -

kompleks atakujący błonę)[14]. Związanie przeciwciała z antygenem może wywoływać również bezpośrednią reakcję cytotoksyczną, dzięki oddziaływaniu z receptorami dla fragmentu Fc przeciwciała (FcγR) występującymi na różnych komórkach efektorowych takich jak makrofagi, neutrofile czy komórki NK[15]. Jakakolwiek modyfikacja we fragmencie Fc przeciwciał może mieć znaczący wpływ na zdolność immunoglobulin do spełniania funkcji efektorowych. Źródła literaturowe wspominają o wpływie niektórych modyfikacji posttranslacyjnych takich jak glikozylacja[16,17] czy oksydacja[18] na zdolność przeciwciał IgG do efektywnego wiązania białka C1q. W tej części pracy przeanalizowaliśmy wzór karbamylacji występujący w przeciwciałach klasy IgG_1 zarówno *in vitro* jak i *in vivo* oraz zbadaliśmy wpływ tych modyfikacji na zdolność przeciwciał IgG do aktywacji klasycznej drogi układu dopełniacza, jak również przebieg procesów cytotoksyczności zależnej od aktywności dopełniacza (CDC) i cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał (ADCC). Ustalono, że tylko wybrane reszty lizyny w przeciwciałach IgG_1 ulegały szybkiej modyfikacji po ich ekspozycji na KCNO. Co bardziej interesujące karbamylacja zachodziła specyficznie na resztach lizyny występujących w regionie zawiasowym przeciwciał i N-końcowym fragmencie domeny CH2. Tworzenie homocytruliny, aminokwasu charakteryzującego się obojętnym ładunkiem, z dodatnio naładowanych reszt lizyny we wspomnianych regionach łańcucha ciężkiego immunoglobulin, okazało się mieć ogromny wpływ na zdolność przeciwciał IgG do wiązania białka C1q, wskazując tym samym na istotność reszty lizyny w pozycji 322 (K322 – oznaczona na niebiesko w Fig.3) dla tego oddziaływaniu.

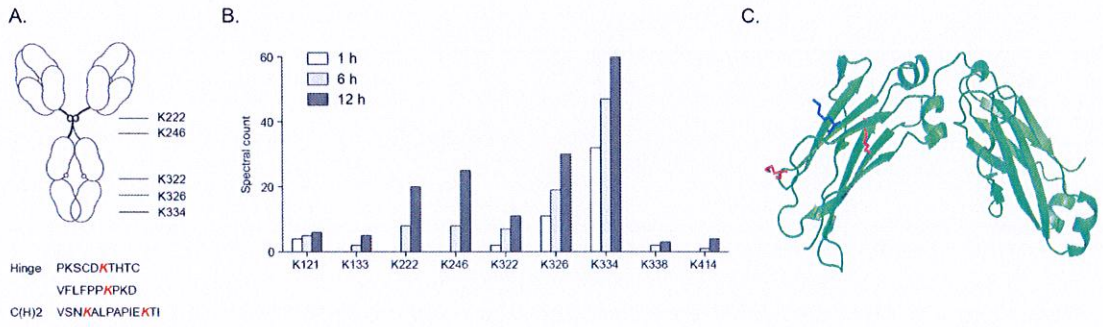


Fig.3 Karbamylacja w domenie CH2 oraz regionie zawiasowym przeciwciał klasy IgG_1. (A) Schematyczna reprezentacja obszarów w przeciwciałach klasy IgG_1, w których zaobserwowano selektywną karbamylację reszt lizyny. Reszty lizyny ulegające modyfikacji z najwyższą częstością zaznaczono na czerwono. (B) Ocena stopnia karbamylacji reszt lizyny w przeciwciałach klasy IgG_1, przypuszczalnie ulegających modyfikacji w zależności od czasu prowadzenia reakcji, z zastosowaniem metod spektrometrii masowej wykorzystującej zliczanie spektralne w określonych punktach czasowych. Każdy słupek reprezentuje liczbę zliczeń z pojedynczego eksperymentu i jest wynikiem reprezentatywnym dla dwóch niezależnych doświadczeń. (C) Trójwymiarowy model struktury fragmentu Fc przeciwciała klasy IgG_1. Lizynę w pozycji 322 oznaczono na niebiesko. Karbamylowane reszty lizyny w pozycjach 326 i 334 oznaczono na czerwono. *Koro et al.*, (2014) *EurJ Immunol* Nov;44(11):3403-12

---

[14] Dunkelberger *et al.* (2010) *Complement and its role in innate and adaptive immune responses*. *Cell Res.* 20:34–50.

[15] Fanger *et al.* (1989) *Cytotoxicity mediated by human Fc receptors for IgG. Immunol. Today.* 10:92–99

[16] Nose *et al.* (1983) Biological significance of carbohydrate chains on monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80:6632–6636

[17] Vestrheim *et al.* (2013) Different glycosylation pattern of human IgG1 and IgG3 antibodies isolated from transiently as well as permanently transfected cell lines. *Scand. J. Immunol.* 77:419–428

[18] Uesugi *et al.* (2000) Inflammatory properties of IgG modified by oxygen radicals and peroxynitrite. *J. Immune* 165:6532–6537

Dramatyczne obniżenie zdolności wiązania C1q (i późniejszego wywoływania CDC) zaobserwowano już po krótkiej ekspozycji przeciwciał (30 min do 3h) na działanie KCNO, w którym to czasie tylko dwie reszty lizyny (K326 i K334), inne niż wcześniej wspomniana K322 ulegały w znacznym stopniu modyfikacji. Z tego względu uznano, że oprócz K322 także K326 i K334 są kluczowe dla efektywnego wiązania białka C1q, a modyfikacja tych reszt zaburza zdolność przeciwciał IgG do wydajnej aktywacji układu dopełniacza (Fig.4). Ważność regionu zawiasowego przeciwciał w wiązaniu białka C1q oraz w procesie rozpoznawania antygenu, została pokazana wcześniej z użyciem metod krystalograficznych, jednak nie była weryfikowana w innych badaniach eksperymentalnych. W zastosowanym przez nas modelu, ekspozycja przeciwciał na KCNO przy dłuższych czasach inkubacji (powyżej 3h) niwelowała ich zdolność do aktywacji komplementu – patrząc na poziom depozycji białka C1q i generowanie CDC - zrównując go do poziomu kontroli negatywnej. Wyniki te były ściśle skorelowane z karbamylacją lizyn K222 i K246, uwydatniając rolę tych reszt występujących w regionie zawiasowym w wiązaniu C1q.

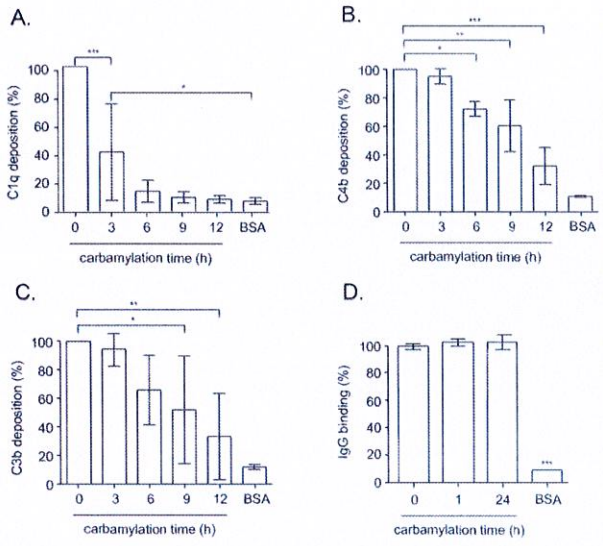


Fig.4 Karbamylacja przeciwciał IgG_1 hamuje wiązanie białka C1q dopełniacza oraz depozycję kolejnych białek kaskady dopełniacza - C4b i C3b. Depozycja białek (A) C1q, (B) C4b i (C) C3b z ludzkiego serum po aktywacji układu dopełniacza karbamylowanymi przeciwciałami IgG_1. Płytki opłaszczono natywnymi i karbamylowanymi, zagregowanymi cieplnie ludzkimi przeciwciałami IgG_1. Depozycję białek komplementu określono z wykorzystaniem metody ELISA. (D) Detekcja natywnych i karbamylowanych, cieplnie zagregowanych ludzkich przeciwciał IgG izolowanych z serum pacjentów ze szpiczakiem. Płytki opłaszczono immunoglobulinami w stężeniu 10µg/ml. Przeciwciała wykrywano z wykorzystaniem metody ELISA. Natywne przeciwciała IgG stanowiły kontrolę pozytywną dla sprawdzenia poprawnego wiązania modyfikowanych immunoglobulin do powierzchni stosowanych płytek. Poziom wiązania natywnych IgG stanowił 100%. Wyniki reprezentują średnią ± SD z co najmniej trzech niezależnych eksperymentów, wykorzystujących próbki w duplikatach. Istotność statystyczna wyników została oszacowana z użyciem one-way ANOVA z post-testem Tukey'a: *p< 0.05; **p< 0.01; ***p< 0.0012014) Koro et al., (2014) Eur J Immunol Nov; 44(11):3403-12

W kontekście wspomnianych wyżej obserwacji interesujące wydają się wyniki innych grup badawczych, pokazujące znaczące obniżenie wiązania C1q przez przeciwciała IgG po wystawieniu tych immunoglobulin na działanie neutrofili. Badania te nie potrafiły jednak określić mechanizmu tego zjawiska, gdyż nie znajdywały potwierdzenia w badaniach *in vitro*, w których poddawano przeciwciała działaniu czynników oksydacyjnych (HOCl i H_2O_2). Sugerujemy, że w tym wypadku utrata funkcji przez przeciwciała IgG była spowodowana

karbamylacją tych białek w wyniku działania systemu MPO/H_2O_2/SCN^- wytwarzanego przez zaktywowane neutrofile.

Potencjalne zastosowanie:

- Przedstawione wyniki pozwalają na lepsze zrozumienie procesów prowadzących do rozwoju reumatoidalnego zapalenia stawów.
- Uzyskane wyniki mogą w przyszłości stanowić podstawę do znalezienia nowych strategii przeciwdziałania i leczenia wspomnianych schorzeń
- Wyniki naszych badań zostały wykorzystane do zaprojektowania nowych testów diagnostycznych.

4.c.4. "Antibodies against carbamylated proteins are present in primary Sjögren's syndrome and are associated with disease severity" *Ann Rheum Dis.* doi: 10.1136/annrheumdis-2015-20775.

Główne osiągnięcia:

- Stwierdzenie obecności autoprzeciwciał przeciwko białkom karbamylowanym (anti-CarP) w serum pacjentów z pierwotnym zespołem Sjögrena (pSS)
- Ocena wartości prognostycznej obecności autoprzeciwciał przeciwko białkom karbamylowanym (anti-CarP) w postępie pierwotnego zespołu Sjögrena

Pierwotny Zespół Sjögrena (pSS) jest autoimmunologiczną chorobą, charakteryzującą się występowaniem chronicznego stanu zapalnego o nieznanej etiologii. Jak większość schorzeń autoimmunologicznych pSS ma podłoże wieloczynnikowe, w rozwoju którego ważną rolę odgrywają zarówno predyspozycje genetyczne jak i czynniki środowiskowe. Szacuje się, że około 0,09-0,72% ludzkiej populacji jest dotknięta tą chorobą[19]. W przebiegu pSS charakterystyczna jest nasilająca się infiltracja komórek jednojądrzastych krwi do gruczołów łzowych i ślinowych, skutkująca uciążliwymi objawami takimi jak suchość oczu i jamy ustnej (*keratoconjunctivitis sicca* – zespół suchego oka i *xerostomia* - suchość w jamie ustnej) oraz zaburzonym funkcjonowaniem tych gruczołów[20-21]. W zaostrzonym przebiegu choroby obserwuje się również obezwładniające zmęczenie oraz rozwój chłoniaków nieziarniczych. Częstość występowania ostatnio wspomnianych dolegliwości jest ok. 16 razy większa u pacjentów z pSS, niż w ogólnej populacji. Wszystkie

[19] Patel *et al.* (2014). *The epidemiology of Sjögren's syndrome. Clin Epidemiol* ;6:247-5

[20] Kapsogeorgou *et al.*(2013) *Minor salivary gland inflammatory lesions in Sjögren syndrome: do they evolve? J Rheumatol* ; 40:1566-71.

[21] Christodoulou *et al.* (2010) Characteristics *of the minor salivary gland infiltrates in Sjögren's syndrome. J Autoimmun* ; 34:400-7

dotychczas testowane sposoby leczenia tej choroby okazywały się nieskuteczne [22]. W krwi pacjentów z pSS można stwierdzić obecność szeregu różnych autoprzeciwciał. U 90% z nich obserwuje się przeciwciała przeciwjądrowe (antinuclear antibodies (ANA)), wykazujące reaktywność przeciwko rybonukleoproteinom Ro/SSA i La/SSB[23], które pojawiają się w serum na kilka lat przed wykryciem choroby, przez co posiadają dużą wartość diagnostyczną[24]. Dodatkowo obecność kilku innych typów autoprzeciwciał, takich jak przeciwciała przeciwko: fragmentowi Fc przeciwciał klasy IgG (czynnik reumatoidalny, RF), receptorowi muskarynowo-acetylocholinowemu typu 3, anhydrazie węglanowej, alfa-fodrynie i w mniejszym stopniu przeciw CCP, została powiązana z tą chorobą[25]. Zrozumienie roli autoprzeciwciał i wykorzystanie ich jako biomarkerów ma ogromne znaczenie dla zrobienia postępów w poznaniu i leczeniu chorób autoimmunologicznych.

W niniejszej części pracy przebadano próbki surowicy pochodzącej od pacjentów z pSS (n=78) oraz zdrowych dawców (n=74) na obecność i poziom przeciwciał anty-CarP. Następnie przeanalizowano czy uzyskane wartości są skorelowane z kluczowymi aspektami patogenezy pSS, począwszy od wywołanego obecnością komórek jednojądrzastych krwi stanu zapalnego i organizacji struktur limfatycznych w śliniankach, do określenia stopnia zaburzenia funkcjonowania tych gruczołów, manifestującego się zmniejszoną sekrecją śliny. Zgodnie z naszą wiedzą, są to pierwsze badania pokazujące częstość występowania przeciwciał skierowanym przeciwko białkom karbamylowanym u pacjentów z pSS. Poziom przeciwciał anty-CarP jest znacząco wyższy w kohorcie pacjentów z zespołem Sjögrena w porównaniu do grupy kontrolnej (odpowiednio 26.9% vs. 6.8%; $p < 0.0001$; Fig. 5).

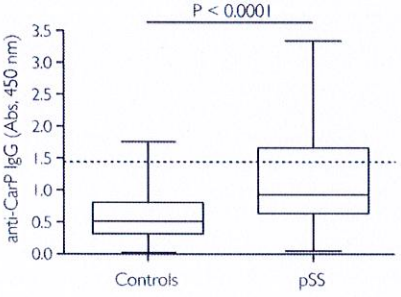


Fig.5 Przeciwciała przeciwko karbamylowanym białkom płodowej surowicy cielęcej (cFCS) u ludzi zdrowych i pacjentów z pierwotnym Zespołem Sjögrena (pSS). Poziome linie reprezentują poziom mediany wyników, a słupki najwyższą i najniższą wartość w poszczególnych grupach. Linia przerywana wskazuje wartość odcięcia powyżej której znajdują się pacjenci uznani za pozytywnych na obecność przeciwciał anty-CarP, liczoną jako średnia + 2 SD dla zdrowych kontroli. Istotność statystyczna wyników została oceniona za pomocą testu U Mann'a-Whitney'a. *Koro et al.*, (2015) *Ann Rheum Dis.*annrheumdis-2015-207751

Poziom tych autoimmunoglobulin w zdrowej kontroli był zgodny z wcześniejszymi doniesieniami. Analiza statystyczna potwierdziła, że wysoki poziom przeciwciał anti-CarP jest skorelowany z focus score (p=0.020), niskim stymulowanym przepływem śliny (p=0.039), wysokimi poziomami: β2-makroglobuliny (p=0.002), RF (p<0.0001), całkowitej liczby przeciwciał klasy IgM (p=0.005) i klasy IgG (p=0.004) w surowicy (Tab.1).

---

[22] Tobon *et al.* (2010) *B cell-targeted therapies in Sjögren's syndrome. Autoimmun Rev* 2010;9:224-8.

[23] Routsias *et al.* (2010) *Autoimmune response and target autoantigens in Sjögren's syndrome. Eur J Clin Invest* ;40:1026-36.

[24] Jonsson *et al.*(2013) *Autoantibodies present before symptom onset in primary Sjögren syndrome. Jama* ;310:1854-5

[25] Kyriakidis *et* al.(2014) *A comprehensive review of autoantibodies in primary Sjögren's syndrome: clinical phenotypes and regulatory mechanisms. J Autoimmun* ;51:67-74.

Table 1. Correlation between serum levels of anti-CarP IgG and various laboratory parameters in patients with primary Sjögren's syndrome

	Spearman's rank test		Spearman partial correlation*	
	r	p-value	r	p-value
Stimulated salivary flow	-0.240	0.039	-0.255	0.060
Focus score	0.287	0.020	0.28	0.022
β2-microglobulin	0.348	0.002	0.23	0.048
RF	0.443	<0.0001	0.34	0.003
IgM	0.318	0.005	0.28	0.014
IgG	0.320	0.004		

Formowanie struktur podobnych do centrów germinalnych (struktury GC podobne) w

* Wszystkie zmienne są reprezentowane jako dane ciągłe. Dane dostosowane do poziomu przeciwciał klasy IgG, wieku oraz czasu trwania choroby. Wartość "Focus score" określa liczbę prozapalnych ognisk w tkance zawierających >50 komórek jednojądrzastych na 4mm2 biopsji. RF, czynnik reumatoidalny.

gruczołach ślinowych jest oznaką postępu choroby i najczęściej wiąże się z gorszymi rokowaniami klinicznymi. Zwiększoną częstość występowania ektopowych struktur GC stwierdzono u seropozytywnych dla anty-CarP chorych z pSS (38.9%) w porównaniu do pacjentów, u których tego rodzaju przeciwciała nie występują (14%). Aby dokładniej określić zależność pomiędzy obecnością przeciwciał anty-CarP i struktur GC podobnych, porównano absolutną wartość poziomu tych autoprzeciwciał u pacjentów pozytywnych i negatywnych na obecność ektopowych centrów germinalnych. Chorzy, u których stwierdzono obecność struktur GC podobnych w gruczołach ślinianek mniejszych posiadali zdecydowanie wyższe

Table 2. Multivariate logistic regression analysis investigating the effect of anti-CarP IgG positivity on the presence of germinal center-like structures

	OR	Std. Err	P value	95% CI of OR
Anti-CarP IgG	9.245	0.946	0.019	1.448–59.044
Age	1.037	0.033	0.273	0.972–1.105
Disease duration	0.965	0.038	0.357	0.895–1.041
RF	0.264	0.989	0.178	0.038–1.836
Anti-Ro/SSA	1.204	1.035	0.857	0.158–9.155
Anti-La/SSB	7.141	0.881	0.026	1.270–40.144

poziomy przeciwciał anty-CarP w krwi obwodowej. Ten wynik skłonił nas do zbadania możliwego wpływu obecności przeciwciał anty-CarP na tworzenie tego rodzaju struktur. Przeprowadzone modelowanie wieloczynnikowej regresji logistycznej, z dostosowaniem parametrów takich jak wiek, czas trwania choroby, poziom przeciwciał RF, anty-Ro/SSA i anty-La/SSB, pokazało, że u pacjentów posiadających przeciwciała anty-CarP występuje 9.2 razy większa szansa na rozwinięcie ektopowych centrów germinalnych w gruczołach ślinianek mniejszych, niż u kontroli negatywnej dla anty-CarP. (p=0.019; Tab.2).

Podsumowując, nasze badania są pierwszymi opisującymi obecność i częstość występowania przeciwciał przeciwko białkom karbamylowanym u pacjentów z pierwotnym zespołem Sjögrena, które wyraźnie łączą obecność tych autoimmunoglobulin z konkretnymi symptomami chorobowymi, a ponad to mogą pomóc w przewidzeniu dalszego przebiegu choroby. Opierając się na uzyskanych przez nas wynikach, racjonalnym postępowaniem wydaje się wprowadzenie testu określającego poziom przeciwciał anty-CarP jako dodatkowego biomarkera w profilu serologicznym pacjentów z pSS, ze względu na skorelowanie ich obecności z patologicznymi procesami obserwowanymi w przebiegu tego schorzenia, takimi jak: tworzenie ognisk infiltracji ślinianek mniejszych przez limfocyty, formowanie struktur GC podobnych i zmniejszonym przepływem śliny. Nowe markery serologiczne, które mogą być wykryte wcześnie w trakcie rozwoju choroby, pozwalają na lepsze monitorowanie stanu zdrowia pacjentów i zastosowanie czynników immunosupresyjnych bez zbędnej zwłoki. Taka strategia leczenia zminimalizuje ryzyko nieodwracalnych uszkodzeń tkanek i pozwoli na zmniejszenie śmiertelności związanej z chorobami współistniejącymi.

Możliwości zastosowania:

- Uzyskane dane potwierdziły użyteczność przeciwciał anty-CarP jako biomarkera, umożliwiającego przewidzenie nasilania stanu chorobowego w pierwotnym zespole Sjögrena oraz określenie potencjalnego ryzyka wystąpienia chorób współtowarzyszących
- Wyniki przeprowadzonych badań pozwoliły na stworzenie nowego testu diagnostycznego.

4.c.5. "Carbamylated LL-37 as a Modulator of the Immune Response" *Innate Immunity, doi:10.1177/1753425916631404*

Główne osiągnięcia:

- Ocena kinetyki i wzoru karbamylacji peptydu antybakteryjnego LL-37
- Charakteryzacja wpływu karbamylacji peptydu LL-37 na jego właściwości bakteriobójcze, cytotoksyczne i immunomodulacyjne

- Ocena wpływu karbamylacji LL-37 na jego powinowactwo do białka nośnikowego apoA-1

Kationowe peptydy antybakteryjne (CAMPs) są podstawowym elementem ludzkiej nieswoistej odpowiedzi immunologicznej, produkowanym przez wiele typów komórek w tym komórki epitelialne, keratynocyty i neutrofile [26,27]. Ludzki arsenał CAMPs stanowią α- i β-defensyny oraz katelicydyna LL-37. Skład aminokwasowy aktywnej formy peptydu LL-37 jest bogaty w reszty argininy i lizyny, które w fizjologicznym pH nadają cząsteczce tego peptydu (wypadkowy) dodatni ładunek (+6). Poza właściwościami bakteriobójczymi względem całego spektrum bakterii patogennych[28], LL-37 ma zdolność do neutralizacji bakteryjnego lipopolisacharydu (LPS), stanowi silny czynnik chemotaktyczny dla komórek immunologicznych (limfocytów T, monocytów, neutrofili i komórek tucznych) [29], spełnia istotną rolę w dojrzewaniu komórek dendrytycznych[30], stymuluje produkcję cytokin,

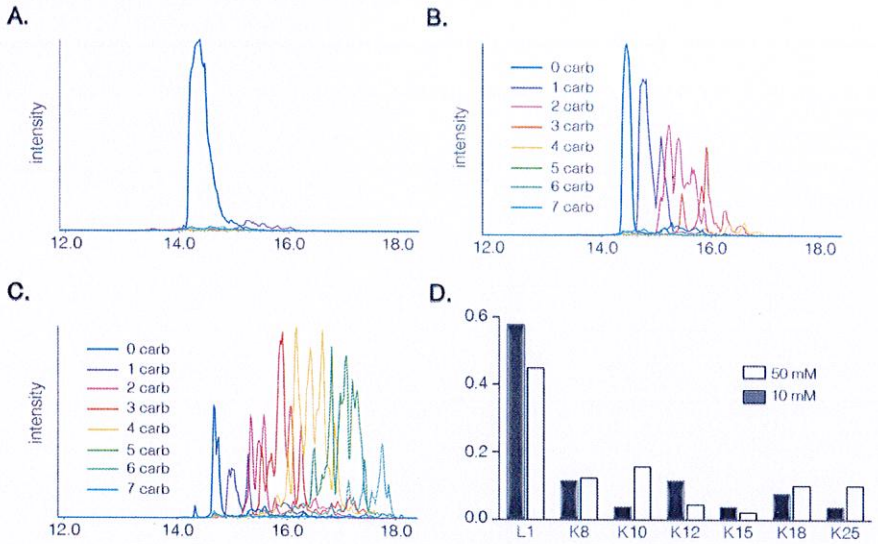


Fig 6. Liczba karbamylowanych reszt aminokwasowych zwiększa się wraz ze wzrostem stężenia KCNO. Peptyd LL-37 inkubowano przez 3h w obecności wzrastających stężeń KCNO. (A) 0mM, (B) 10mM, (C) 50mM. Próbki analizowano za pomocą chromatografu cieczowego sprzęgniętego ze spektrometrem masowym (LC)-MS/MS. Wyznaczono wartości m/z korespondujące z LL-37 natywnym (0) oraz posiadającym 17 karbamylowanych reszt aminokwasowych (patrz. legenda z kolorami kodującymi ilość zmian). Wywołana ekspozycją na KCNO karbamylacja LL-37 skutkuje powstaniem heterogenicznej populacji zmodyfikowanych peptydów, o czym świadczy pojawienie się wielu pików. (D) N-końcowa reszta leucyny (L1) i lizyna w pozycji 8 łańcucha peptydowego LL-37 są silnie dostępne dla zachodzenia reakcji karbamylacji. LL-37 inkubowano z 10mM lub 50mM KCNO przez 1h w 37°C. Pozycja zmodyfikowanych reszt aminokwasowych została określona przy użyciu NanoESI-MS/MS po trawieniu proteazą V8. Liczby spektralne zostały obliczone przez zsumowanie liczby widm odpowiadających zidentyfikowanym peptydom. *Koro et al.* (2016) *Innate Immunity*

[26] Sørensen *et al.* (2001) *"Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3", Blood;* 15;97:3951–3959

[27] Bals *et al.* (1998) *"The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface", Proc Natl Acad Sci USA;* 4;95:9541–9546

[28] Duplantier *et al.* (2013) *"The human cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 as a potential treatment for polymicrobial infected wounds", Front Immunol;* 4:143

[29] De Yang *et al.* (2000) "LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells" *J Exp Med;* 192:1069–1074.

[30] Davidson *et al.* (2004) "The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization", *J Immunol Baltim Md 1950;*172:1146–1156

chemokin oraz ich receptorów[31] oraz inicjuje degranulację komórek tucznych. Wszystkie wspomniane powyżej efekty przynajmniej w części są konsekwencją aktywacji jednego z co najmniej czterech różnych receptorów: r. formylowanych peptydów typu 1 (FPRL1), r. epidermalnego czynnika wzrostu (EGFR), P2X7, oraz CXR2. Ostatnie badania wskazują również na bezpośredni wpływ LL-37 na jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMCs). Szczególnie w wysokich stężeniach może mieć on charakter hemolityczny[32] lub cytotoksyczny[33], z kolei w niskich (<5 μM) LL-37 indukuje gwałtowną wtórną nekrozę apoptotycznych ludzkich neutrofili. W celu przeciwdziałania uszkodzeniu tkanek, będącego ubocznym skutkiem zaostrzenia stanu zapalnego, aktywność LL-37 jest ściśle kontrolowana przez białka obecne w surowicy, głównie przez apolipoproteinę-A1 (apoA1) [34]. Biorąc pod uwagę wszystkie dostępne dane literaturowe można stwierdzić, że antybakteryjna aktywność LL-37 jest wtórna w stosunku do jego funkcji immunomodulacyjnej, co odwraca przyjęty wcześniej paradygmat, sugerujący że główną rolą CAMPs jest bezpośrednie zabijanie patogenów. Obecnie powszechnie przyjmuje się, iż działają one raczej jako cząsteczki sygnałowe w systemach wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicznej. W środowisku występowania stanu zapalnego, któremu towarzyszy uwalnianie LL-37 i MPO przez zaktywowane neutrofile, panują doskonałe warunki dla modyfikacji tego pierwszego na drodze reakcji karbamylacji. Jest to o tyle istotne, iż reszty lizyny występujące w CAMPs są kluczowe dla prawidłowej struktury i funkcji tych peptydów. Można oczekiwać, że zamiana pozytywnie naładowanych reszt lizyny na obojętne reszty homocytruliny, będzie skutkować wyłączeniem aktywności biologicznej LL-37. Dlatego też istotnym wydaje się zbadanie wpływu karbamylacji na immunomodulacyjne i cytotoksyczne funkcje LL-37, przed wprowadzeniem pochodnych tej katelicydyny jako potencjalnych, klinicznych środków terapeutycznych. W niniejszej części pracy zbadano wpływ karbamylacji na biologiczne funkcje peptydu LL-37.

Nasze badania pokazują, że LL-37 ulega szybkiej modyfikacji w obecności cyjanianów, a wynikiem tej reakcji jest powstanie szeregu peptydów różniących się wzorem karbamylacji. Używając metod spektroskopii masowej stwierdzono zależność zwiększania liczby karbamylowanych reszt aminokwasowych w LL-37 od czasu prowadzenia reakcji i stężenia cyjanianów (Fig. 6A-D). Już po 10 minutach inkubacji w obecności 10mM KCNO (stężenie równoważne do poziomu jaki występuje w obszarach rozwoju stanu zapalnego) wykryto wiele form modyfikowanego LL-37 w mieszaninie reakcyjnej. Rozdział produktów karbamylacji za pomocą RP-HPLC i późniejsza dokładna analiza chromatogramów z

---

[31] Pistolic *et al.* (2009) "*Host defence peptide LL-37 induces IL-6 expression in human bronchial epithelial cells by activation of the NF-kappaB signaling pathway*", *J Innate Immun*;1:254–267

[32] Oren *et al.* (1999) "*Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity*", *Biochem J*;341 (Pt 3):501–513

[33] Li *et al.* (2009) "*Secondary necrosis of apoptotic neutrophils induced by the human cathelicidin LL-37 is not proinflammatory to phagocytosing macrophages*", *J Leukoc Biol* ;86:891–902

[34] Wang *et al.* (1998) "*Apolipoprotein A-I binds and inhibits the human antibacterial/cytotoxic peptide LL-37*", *J Biol Chem* ; 273:33115–33118

wzorami elucyjnymi zmodyfikowanych peptydów ujawniła, iż w trakcie prowadzenia reakcji dochodzi do powstawania głównie dwóch, różniących się między sobą form LL-37, jednak charakteryzujących się występowaniem tylko pojedynczej modyfikacji. Prawie 70% odnotowanych zmian stanowiły pojedyncze substytucje reszt lizyny, jednak zidentyfikowano również cały szereg form peptydu, w których stwierdzono obecność dwóch, trzech lub czterech reszt homocytruliny (Fig. 6B). Zarówno zwiększenie stężenia cyjanianu jak i wydłużenie czasu inkubacji skutkowało zmianą wzoru karbamylacji w kierunku wielopunktowej modyfikacji peptydu, a tym samym powstaniu bardziej heterogenicznej mieszaniny. Rozdział chromatograficzny peptydów charakteryzujących się taką samą masą molową, niosących jedną lub więcej karbamylowanych reszt aminokwasowych, ujawnił szereg pików (linie oznaczone tym samym kolorem na Fig. 6C), których wzór jest zależny od występowania konkretnej kombinacji zmodyfikowanych grup. Dane te wskazują, że wszystkie sześć reszt lizyny występujące w łańcuchu LL-37, są równie podatne na karbamylację. Aby odkryć funkcjonalne znaczenie karbamylacji LL-37 nasze dalsze prace skupiły się na formach peptydu, których obecność zidentyfikowano w warunkach reakcji najbardziej przypominających te, panujące w środowisku występowania stanu zapalnego. Sumując liczbę widm odpowiadających poszczególnym zidentyfikowanym peptydom, odkryto, że główna forma LL-37 obecna w mieszaninie reakcyjnej po 1h inkubacji w obecności 10mM KCNO charakteryzowała się modyfikacją N-końca peptydu (α-karbamyl-Leu-1 LL-37; $LL37^{C1}$). Drugą najczęściej występującą pojedynczą modyfikacją była obecność homocytruliny w pozycji 8 ($LL37^{C8}$). Długotrwała inkubacja z KCNO skutkowała powstaniem mieszaniny różnych form LL-37, zawierających reszty homocytruliny na losowych pozycjach. Spośród nich jednym z częściej wykrywanych był peptyd z podwójną modyfikacją na pozycjach 12 i 15 ($LL\text{-}37^{C12,15}$). Opierając się na powyższych danych, do dalszych eksperymentów przygotowano syntetyczne peptydy niosące następujące modyfikacje $LL37^{C1}$, $LL\text{-}37^{C8}$ i $LL\text{-}37^{C12,15}$ (Tabela 3).

Tabela 3. Formy peptydu LL-37 wykryte, zsyntetyzowane i użyte w badaniach

Peptyd	Sekwencja aminokwasowa
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES
$LL\text{-}37^{C1}$	(α- carb-L)LGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES
$LL\text{-}37^{C8}$	LLGDFFR(ε-carb-K)SKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES
$LL\text{-}37^{C12,15}$	LLGDFFRKSKE(ε-carb-K)IG(ε-carb-K)EFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES

LL-37 wchodzi w interakcję z powierzchnią komórek bakteryjnych dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym i hydrofobowym, powodując permeabilizację błony i zniszczenie patogenu. Stosując metodę mikrorozcieńczeń w bulionie stwierdzono, że

antybakteryjna aktywność LL-37 jest silnie zaburzona przez karbamylację. Zmodyfikowane formy peptydu $LL37^{C8}$ i $LL37^{C12,15}$ w stężeniu 1 μg/ml (i.e., 0.2 μM) wykazały zmniejszoną zdolność do hamowania wzrostu bakterii *B. subtilis* w porównaniu z natywnym peptydem ($p < 0.05$ i $p < 0.001$). Dodatkowo dla formy $LL37^{C12,15}$ stwierdzono obniżenie potencjału bakteriostatycznego względem *E. coli* ($p < 0.001$) i *S. aureus* ($p < 0.05$) w porównaniu do niezmodyfikowanego LL-37. Karbamylacja N-terminalnej reszty aminokwasowej peptydu ($LL37^{C1}$) nie wpłynęła na zmianę jego właściwości antybakteryjnych (Fig. 7), co stoi w zgodzie z wcześniejszymi obserwacjami, stwierdzającymi, iż redukcja liczby reszt aminokwasowych na N-końcu peptydu ma tylko niewielki efekt na jego właściwości bakteriobójcze.

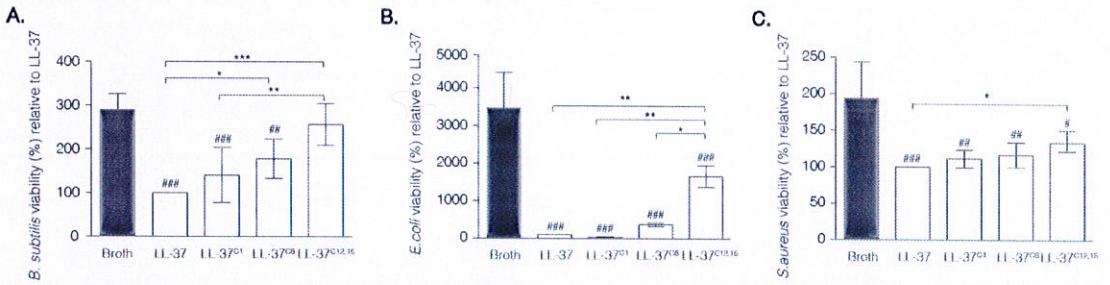


Fig. 7. Karbamylacja zaburza antybakteryjną aktywność LL-37. (A-C) Liczba jednostek tworzących kolonie (CFU) po inkubacji z (A) B. subtilis, (B) E. coli, (C) S. aureus. Wszystkie gatunki bakterii były inkubowane z karbamylowanym lub natywnym peptydem LL-37. Wzrost bakterii w obecności natywnego LL-37 stanowi 100%. Wyniki zaprezentowano w postaci średniej ± SD. Statystyczna istotność wyników została potwierdzona testem one-way ANOVA, z post-testem Tukey'a *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001; i #p < 0.05, ##p < 0.01, i ###p < 0.001 w porównaniu do kontroli negatywnej (medium hodowlane). *Koro et al.*, (2016) *Innate Immunity*

Peptyd LL-37 może wykazywać efekt cytotoksyczny w stosunku do komórek gospodarza, dlatego też zdecydowano o użyciu bardzo czułego testu hemolitycznego, aby zbadać wpływ karbamylacji na zdolność katelicydyny do permeabilizacji błon komórkowych erytrocytów. Uzyskane wyniki pokazały, iż $LL37^{C1}$ wywiera bardzo silny, zależny od stężenia, efekt lityczny, możliwy do zaobserwowania w postaci znacznego wzrostu w ilości uwalnianej z erytrocytów hemoglobiny, już przy stężeniu peptydu wynoszącym 2μM (# $p < 0.05$ w porównaniu do buforu PBS). Półmaksymalny efekt, czyli stężenie peptydu przy którym dochodziło do lizy 50% erytrocytów eksponowanych na jego obecność, wynosiło dla $LL37^{C1}$ 17.9 μM. Odwrotnie, formy peptydu $LL37^{C8}$ i $LL37^{C12,15}$ wykazywały zdecydowanie niższą zdolność do tworzenia porów w błonie czerwonych krwinek. Komórki te były odporne na lizę w obecności $LL37^{C12,15}$ nawet przy stężeniu 20 μM peptydu. Biorąc pod uwagę, że stężenie LL-37 może łatwo osiągać poziom 20 μM w miejscach występowania stanu zapalnego (a stężenia rzędu 250 μM były opisywane w wypadku ognisk łuszczycowych), zachodząca permeabilizacja błon komórkowych wspomaga uwalnianie do przestrzeni zewnątrzkomórkowej różnych potencjalnie szkodliwych substancji z wnętrza komórek, które

z kolei aktywując neutrofile, mogą prowadzić do dalszego zwiększania potencjału karbamylacyjnego (Fig. 8).

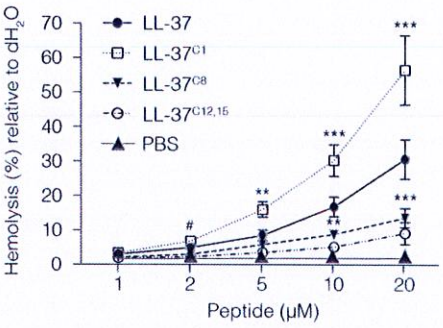


Fig. 8 Karbamylacja znacząco wpływa na hemolityczną aktywność LL37. Erytrocyty inkubowano przez 2h w obecności wskazanych na wykresie form LL-37 użytych w stężeniach 1-20 μM. Aktywność hemolityczną peptydów oceniono na podstawie ilości hemoglobiny uwolnionej z ludzkich erytrocytów (pomiar absorbancji przy dł. fali 405nm) . Wyniki z czterech niezależnych eksperymentów przedstawiono w postaci średniej ± SD. Istotność statystyczną oceniono przy pomocy testu statystycznego one-way ANOVA, z post testem Dunnetta >>> *p <0.05, **p < 0.01 i ***p < 0.001, porównując z LL-37. # p < 0.05 w przypadku LL-37^{C1} porównując buforem PBS. *Koro et al.*, (2016) *Innate Immunity*

Antybakteryjna i cytotoksyczna aktywność LL-37 jest skutecznie hamowana w ludzkim osoczu. Ten efekt jest osiągany poprzez interakcję zachodzącą pomiędzy LL-37 a jego białkiem nośnikowym apoA-1, która zależy od hydrofobowości N-końcowego fragmentu katelicydyny, jak i jej α-helikalnej struktury. Nasze wyniki potwierdzają wyższe powinowactwo modyfikowanego peptydu LL37^{C1} wobec apoA-1 (300% w porównaniu z kontrolą natywną), wskazując jednocześnie, że wcześniej pokazany cytotoksyczny charakter tej formy może być niwelowany przez mechanizm zależny od wiązania z apoA-1. Odpowiednio też, potwierdzono niższe powinowactwo formy LL37^{C12,15} do wiązania apolipoproteinyA-1. Związana z karbamylacją, dwóch lub większej liczby reszt lizyny, znacząca utrata pozytywnego ładunku cząsteczki peptydu, osłabia elektrostatyczną interakcję z charakteryzującą się wypadkowym ujemnym ładunkiem molekułą apoA-1.

Podsumowując, karbamylacja ma znaczący wpływ na bakteriostatyczne, cytotoksyczne i prozapalne właściwości LL-37, a jej zachodzenie może mieć szkodliwe skutki dla gospodarza. Wzór karbamylacji danego peptydu jest zależny od stężenia jonów OCN^- oraz czasu ekspozycji na ten czynnik, sugerując, że kolejne efekty tej modyfikacji są trudne do przewidzenia, a tym samym do kontrolowania w warunkach *in vivo*. Wyniki naszej pracy sugerują, że należy zachować szczególną ostrożność w trakcie prób podawania pacjentom peptydów będących pochodnymi katelicydyny, u których postępująca choroba manifestuje się obecnością stanu zapalnego - takimi jak silne infekcje czy sepsa.

Potencjalne zastosowanie:

- Zaprezentowane dane mogą znaleźć w przyszłości zastosowanie przy efektywnym projektowaniu syntetycznych peptydów antybakteryjnych.
- Lepsze zrozumienie potencjalnych efektów ubocznych stosowania peptydów opartych o LL-37 w leczeniu chorób zapalnych i zakaźnych

5. INNE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWE

W niniejszej części autoreferatu umieszczono informacje o osiągnięciach naukowych niezawartych w rozprawie habilitacyjnej. Opisane tu prace dotyczą głównie badania etiologii oraz leczenia przewlekłego stanu zapalnego i chorób zakaźnych. Różne aspekty badań zostały przedstawione w osobnych podrozdziałach.

5.1. Modyfikacje posttranslacyjne jako czynnik etiologiczny i potencjalny cel w terapii chorób zakaźnych i chorób charakteryzujących się obecnością przewlekłego stanu zapalnego

Modyfikacje posttranslacyjne aminokwasów w łańcuchach białkowych, skutkujące wprowadzeniem różnych grup funkcyjnych, są wykorzystywane w komórkowej strategii zwiększenia liczby funkcjonalnych białek. W pracach wypunktowanych poniżej badaliśmy rolę cytrulinacji i pyroglutaminacji w rozwoju przewlekłego stanu zapalnego i chorobach zakaźnych. Przetestowaliśmy również wpływ szeregu inhibitorów reakcji pyroglutaminacji na stopień rozwoju stanu zapalnego.

Istotne publikacje

1. Goulas T, Mizgalska D, Garcia-Ferrer I, Kantyka T, Guevara T, Szmigielski B, Sroka A, Millán C, Usón I, Veillard F, Potempa B, Mydel P, Solà M, Potempa J, Gomis-Rüth FX. (2015) "Structure and mechanism of a bacterial host-protein citrullinating virulence factor, Porphyromonas gingivalis peptidylarginine deiminase" *Sci Rep.* 2015 Jul 1;5:11969. doi: 10.1038/srep11969
2. Maresz KJ, Hellvard A, Sroka A, Adamowicz K, Bielecka E, Koziel J, Gawron K, Mizgalska D, Marcinska KA, Benedyk M, Pyrc K, Quirke AM, Jonsson R, Alzabin S, Venables PJ, Nguyen KA, Mydel P, Potempa J. (2013) "Porphyromonas gingivalis facilitates the development and progression of destructive arthritis through its unique bacterial peptidylarginine deiminase (PAD)".*PLoS Pathog.* 2013 Sep;9(9):e1003627. doi: 10.1371/journal.ppat.1003627
3. Hellvard A, Maresz K, Schilling S, Graubner S, Heiser U, Jonsson R, Cynis H, Demuth HU, Potempa J, Mydel P. (2013) "Glutaminyl cyclases as novel targets for the treatment of septic arthritis". J Infect Dis. 207(5):768-77. doi:10.1093/infdis/jis729

5.2. Nowe podejście do klasyfikacji pacjentów z pierwotnym Zespołem Sjögrena

Pierwotny zespół Sjögrena dotyka ~ 0,05% populacji ludzkiej na świecie. Schorzenie to charakteryzuje patologiczna odpowiedź autoimmunologiczna skierowana głównie przeciwko gruczołom wydzielania zewnętrznego. Obecnie obowiązujące standardy klasyfikacji pacjentów z Zespołem Sjögrena, ustalone przez The American–European Consensus Group, łączą ocenę symptomów takich jak suchość w ustach, zespół suchego oka, szacowanie

zdolności sekrecyjnej egzokrynnych gruczołów i obecność autoprzeciwciał dla Ro i La. Dodatkowo stworzona przez AECG klasyfikacja opiera się o inwazyjną metodę pobierania fragmentów tkanek ze ślinianek mniejszych i ich późniejszą ocenę histopatologiczznną. Ewidentnie oparcie diagnostyki na materiale pochodzącym z biopsji znacznie utrudnia efektywną ocenę występowania Zespołu Sjögrena u poszczególnych jednostek oraz kompleksową ocenę aktywności choroby w czasie. Znalezienie dobrego, zweryfikowanego biomarkera dla tej choroby w ślinie, dałoby możliwość rozwiązania kilku etycznych i technicznych problemów, które obecnie stanowią duże utrudnienie dla odpowiedniego monitorowania pacjentów oraz oceny skuteczności nowo stosowanych terapii.

Istotne publikacje

4. Delaleu N, Mydel P, Brun J, Jonsson M, Alimonti A, and Jonsson R (2016) "Sjögren's syndrome patients with ectopic germinal centers present with a distinct salivary proteome" Rheumatology doi: 10.1093/rheumatology/kew013
5. Delaleu N, Mydel P, Kwee I, Brun JG, Jonsson MV, Jonsson R. (2015) "High fidelity between saliva proteomics and the biologic state of salivary glands defines biomarker signatures for primary Sjögren's syndrome". Arthritis Rheumatol. 2015 Apr;67(4):1084-95. doi: 10.1002/art.39015.
6. Valim V, Gerdts E, Jonsson R, Ferreira G, Brokstad K, Brun J, Midtbø H, Mydel P (2016) "Atherosclerosis in Sjögren's syndrome: evidence, possible mechanisms and knowledge gaps"Clin Exp Rheumatol. 2016 Jan-Feb;34(1):133-42 PMID: 26812164

5.3. Molekularne mechanizmy stanu zapalnego

Cechą charakterystyczną wielu chorób, w tym reumatoidalnego zapalenia stawów, chorób przyzębia czy układu sercowo-naczyniowego, jest rozwój przewlekłego stanu zapalnego u osób genetycznie podatnych na wystąpienie tych schorzeń. W związku z tym, istnieje duże zainteresowanie oraz pilna potrzeba zrozumienia molekularnych procesów wyzwalających powstawanie stanu zapalnego, jak również szukania nowych strategii leczenia. W pracach wymienionych poniżej badaliśmy rolę enzymów proteolitycznych, cząsteczek sygnałowych, receptorów, czynników transkrypcyjnych i czynników środowiskowych mających znaczący wkład w wywoływanie i postęp procesów zapalnych.

Istotne publikacje

7. Benedyk M, Mydel P, Delaleu N, Plaza K, Gawron K, Milewska K, Maresz K, Koziel J, Pyrc K, Potempa J. (2015) "Gingipains: critical factors in the development of aspiration pneumonia caused by Porphyromonas gingivalis"J Innate Immun. doi:10.1159/000441724
8. Nepal C, Coolen M, Hadzhiev Y, Cussigh D, Mydel P, Steen V, Carninci P, Andersen J, Cuif L, Müller F, Lenhard B. (2015) "Transcriptional, post-transcriptional and chromatin associated regulation of pri-miRNAs, pre-miRNAs and moRNAs" Nucleic Acids Res doi: 10.1093/nar/gkv1354
9. Stanford SM, Svensson MN, Sacchetti C, Pilo CA, Wu DJ, Kiosses WB, Hellvard A, Bergum B, Aleman Muench GR, Elly C, Liu YC, den Hertog J, Elson A, Sap J, Mydel P, Boyle DL, Corr M, Firestein GS, Bottini N (2015) "Receptor protein tyrosine phosphatase alpha enhances rheumatoid

synovial fibroblast signaling and promotes arthritis in mice" Arthritis Rheumatol. doi: 10.1002/art. 39442

10. Koziel J, Mydel P, Potempa J. (2014) "The link between periodontal disease and rheumatoid arthritis: an updated review". Curr Rheumatol Rep. 2014 Mar;16(3):408. doi: 10.1007/s11926-014-0408-9.
11. Koziel J, Kmiecik K, Chmiest D, Maresz K, Mizgalska D, Maciag-Gudowska A, Mydel P, Potempa J. (2008) "The role of Mcl-1 in S. aureus-induced cytoprotection of infected macrophages". Mediators Inflamm. 2013;2013:427021. doi: 10.1155/2013 /427021
12. Lindblad SS, Mydel P, Hellvard A, Jonsson IM, Bokarewa MI. "The N-methyl-d-aspartic acid receptor antagonist memantine ameliorates and delays the development of arthritis by enhancing regulatory T cells". (2012) Neurosignals. 2012;20(2):61-71. doi: 10.1159/000329551
13. Lindblad SS, Mydel P, Jonsson IM, Senior RM, Tarkowski A, Bokarewa M. (2009) "Smoking and nicotine exposure delay development of collagen-induced arthritis in mice". Arthritis Res Ther. 2009;11(3):R88. doi: 10.1186/ar2728
14. Mydel P, Shipley JM, Adair-Kirk TL, Kelley DG, Broekelmann TJ, Mecham RP, Senior RM. (2008) "Neutrophil elastase cleaves laminin-332 (laminin-5) generating peptides that are chemotactic for neutrophils". J Biol Chem. 2008 Apr 11;283(15):9513-22. doi: 10.1074/jbc.M706239200
15. Josefsson E, Kubica M, Mydel P, Potempa J, Tarkowski A. (2008) "In vivo sortase A and clumping factor A mRNA expression during Staphylococcus aureus infection". Microb Pathog. 2008 Feb;44(2): 103-10
16. Bylund J, MacDonald KL, Brown KL, Mydel P, Collins LV, Hancock RE, Speert DP. (2007) "Enhanced inflammatory responses of chronic granulomatous disease leukocytes involve ROS-independent activation of NF-kappa B" Eur J Immunol. 2007 Apr;37(4):1087-96
17. Mydel P, Takahashi Y, Yumoto H, Sztukowska M, Kubica M, Gibson FC 3rd, Kurtz DM Jr, Travis J, Collins LV, Nguyen KA, Genco CA, Potempa J. "Roles of the host oxidative immune response and bacterial antioxidant rubrerythrin during Porphyromonas gingivalis infection". PLoS Pathog. 2006 Jul;2(7):e76
18. Sieprawska-Lupa M, Mydel P, Krawczyk K, Wójcik K, Puklo M, Lupa B, Suder P, Silberring J, Reed M, Pohl J, Shafer W, McAleese F, Foster T, Travis J, Potempa J. (2004) "Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by Staphylococcus aureus-derived proteinases". Antimicrob Agents Chemother. 2004 Dec;48(12):4673-9

Mydel