Prof. dr hab. Barbara Lipińska
Katedra Biochemii Ogólnej i Medycznej
Wydział Biologii,
Uniwersytet Gdański,
Wita Stwosza 59, 80-308 Gdańsk
tel. +48- 58 523 6055
tel/fax +48-58 523 6064
E-mail: barbara.lipinska@biol.ug.edu.pl

Gdańsk, 16.07.2016

RECENZJA OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO I DOROBKU NAUKOWEGO DR PIOTRA MYDELA

Osiągnięcie naukowe pana dr Piotra Mydela, zatytułowane: „Karbamylacja jako czynnik modulujący odpowiedź immunologiczną", złożone jest z 4 oryginalnych prac eksperymentalnych, opublikowanych w latach 2010-2016. Jest to stosunkowo niewielka liczba prac lecz zostały one opublikowane w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym: *J. Immunol*, *Eur J Immunol*, *Ann Rheum Dis* i *Innate Immunity*. Czasopisma te są bardzo prestiżowe, o czym świadczy ich wysoki *impact factor* (IF odpowiednio: 5.75, 4.034, 10.377 i 4.352). Ponadto, najstarsza z prac (*J. Immunol*, 2010) była wielokrotnie (50-krotnie) cytowane, co świadczy o zainteresowaniu środowiska naukowego pracą i jej wpływie na rozwój badań. Pozostałe prace nie były cytowane, co może wynikać stąd, że były opublikowane niedawno, w latach 2014-16. Habilitant jest pierwszym autorem pierwszej pracy oraz autorem korespondującym trzech ozostałych. Ten ostatni fakt bardzo dobrze świadczy o dojrzałości naukowej i samodzielności habilitanta.

Publikacje przedstawione jako osiągnięcie naukowe stanowią zwartą tematycznie całość, opisującą badania Autora nad rolą białek potranslacyjnie modyfikowanych przez karbamylację (CarP) w rozwoju odpowiedzi immunologicznej oraz możliwością zastosowania przeciwciał przeciwko karbamylowanym białkom (anty-CarP) w diagnostyce chorób autoimmunologicznych. Badania te zostały przeprowadzone w trakcie staży podoktorskich odbytych przez dr Mydela na Uniwersytetach w Goteborgu oraz Bergen, w Szwecji.

Karbamylacja jest powszechnie zachodzacą, nieenzymatyczną modyfikacją peptydów i białek, która nastąpuje w efekcie reakcji jonów cyjanianowych z grupami α-aminowymi N-końcowych aminokwasów lub ε-aminowymi lizyn znajdujących się wewnątrz łańcucha. Powstają w ten sposób reszty α-karbamylowanych aminokwasów lub ε-karbamylo-lizyny (homocytruliny). Karbamylacja z jednej strony może upośledzić biologiczną funkcję białka, z drugiej zaś strony reszty homocytruliny mogą stanowić neo-epitopy wywołujące pierwotną odpowiedź immunologiczną, której towarzyszy zwiększona proliferacja i migracja limfocytów CD4+, i produkcja cytokin pro- oraz antyzapalnych. Chroniczny stan zapalny jest typowym objawem chorób autoimmunologicznych, w tym reumatoidalnego zapalenia stawów, RZS.

Dotychczas wiadomo było, że białka modyfikowane przez cytrulinację odgrywają istotną, choć nie do końca wyjaśnioną rolę w etiologii RZS i od szeregu lat w tym schorzeniu stosuje się jako czynnik diagnostyczny poziom przeciwciał skierowanych przeciwko białkom cytrulinowanym. Rola karbamylacji, generującej białka homocytrulinowane, czyli podobne do cytrulinowanych, w rozwoju chorób autoimmunologicznych nie była wyjaśniona. Tak więc, tematyka badawcza podjęta przez Habilitanta, dotycząca patogennego znaczenia karbamylacji a także cech diagnostycznych przeciwciał rozpoznających karbamylowane białka, anty-CarP, jest zasadna z punktu widzenia poznawczego oraz aplikacyjnego.

Badania pokazane w pierwszej publikacji (*J Immunol*, 184, 6882-90 (2010)) z cyklu stanowiącego osiągnięcie naukowe Habilitanta pozwoliły na udowodnienie komplementarngo efektu cytrulinacji i karbamylacji białek w rozwoju RZS u myszy. Zademonstrowano, że immunizacja myszy peptydami zawierającymi homocytrulinę (Hcit) indukowała chemotaksję i aktywację limfocytów T oraz produkcję przeciwciał anty-Hcit. Co istotne, myszy immunizowane karbamylowanymi peptydami stały się bardziej podatne na rozwój zapalenia stawów wywołanego dostawową iniekcją peptydów cytrulinowanych. Przeniesienie limfocytów B i T myszy immunizowanych homocytruliną do myszy zdrowych indukowało stan zapalny stawów, natomiast iniekcja przeciwciał anty-HCit nie dawała tego efektu. Można więc było wnioskować, że odpowiedź limfocytów T na homocytrulinowane peptydy oraz następująca produkcja przeciwciał anty-Hcit są istotne w indukowaniu odpowiedzi autoimmunologicznej i patogenezie RZS w modelu mysim. Co więcej, u pacjentów z zaostrzonym przebiegiem RZS pokazano zwiększony poziom przeciwciał anty-HCit. Wyniki tych badań pozwoliły na lepsze zrozumienie procesów prowadzących do rozwoju RZS, mogą one także ułatwić projektowanie nowych metod terapeutycznych oraz ulepszyć metody diagnostyczne. Pracę tę uważam za najcenniejszą w prezentowanym cyklu.

Badania przedstawione w kolejnej publikacji (*Eur J Immunol*, 44, 3403-12 (2014)), dotyczyły karbamylacji przeciwciał klasy IgG powstających w warunkach stanu zapalnego oraz wpływu karbamylacji IgG na aktywację klasycznej kaskady dopełniacza. Wykazano, że chemiczna karbamylacja IgG zachodziła w określonych miejscach cząsteczki IgG (jedynie 5 z 26 reszt lizyny ulegało modyfikacji), oraz że karbamylacja hamowała przyłączanie się do IgG białka C1q będącego inicjatorem klasycznej drogi aktywacji dopełniacza. Co więcej, w warunkach *in vitro* karbamylacja hamowała zależną od dopełniacza cytotoksyczność monoklonalnego przeciwciała, rituximabu. Przeciwciało to jest skierowane przeciwko receptorowi CD20 limfocytów B i stosowane jest jako lek immunosupresyjny i przeciwnowotworowy. Z uwagi na to, że karbamylowane immunoglobuliny wykryto w płynie maziowym pacjentów z RZS, powyższe wyniki pozwalają przypuszczać, że karbamylacja IgG może wpływać na ich zdolność do indukowania systemu dopełniacza.

Trzecia publikacja (*Ann Rheum Dis*, 2015-20775) zawiera wyniki oznaczania autoprzeciwciał anty-CarP w surowicy pacjentów z pierwotnym syndromem Sjorgena, autoimmunologicznym chronicznym schorzeniem o nieznanej etiologii, objawiającym się stanem zapalnym gruczołów łzowych i ślinowych. Stwierdzono występowanie przeciwciał anty-CarP u 27% pacjentów, przy czym obecność ich była związana z zaostrzonym procesem zapalnym. Sugeruje to, że oznaczanie poziomu anty-CarP może mieć wartość progostyczną.

Ostatnia praca z tego cyklu (*Innate Immunity*, 22, 218-29 (2016)) dotyczy wpływu karbamylacji defensyny, antybakteryjnego peptydu LL-37 na jego własności bakteriobójcze oraz immunomodulacyjne. Wykazano, że peptyd LL-37 ulega karbamylacji *in vitro*, że modyfikacja ta wpływa na jego strukturę i osłabia antybakteryjne działanie, oraz że karbamylowany LL-37 może działać prozapalnie.

W podsumowaniu stwierdzam, że wyniki badań przedstawionych jako osiągniecie naukowe są oryginalne, nowatorskie i w istotny sposób pogłębiły zrozumienie roli karbamylowanych białek, w tym immunoglobulin, na odpowiedź immunologiczną. Ponadto, wyniki tych prac mogą wpłynąć pozytywnie na diagnostykę i prognostykę chorób autoimmunologicznych objawiających się przewlekłymi stanami zapalnymi

Doświadczenia zaprezentowane w osiągnięciu naukowym są na wysokim poziomie metodycznym. Zostały tu zastosowane bardzo różnorodne techniki z dziedziny biochemii, immunologii i biologii komórki. Rozprawa habilitacyjna pozwala ocenić Autora jako dojrzałego, samodzielnego badacza zdolnego do zaproponowania i rozwiązania oryginalnego problemu naukowego. Jednakże uważam, że osiągnięcie byłoby bardziej kompletne gdyby zawierało pracę przeglądową dotyczącą karbamylacji białek i jej związku z odpowiedzią immunologiczną. Praca taka mogłaby stanowić klamrę spinającą cykl publikacji eksperymentalnych.

Mam pewne wątpliwości dotyczące udziału Habilitanta w poszczególnych pracach. Dziwi bardzo dokładne obliczenie tego udziału, które ocenił on na : 51.65, 51.87, 52.21 i 52.98% w sytuacji, gdzie współautorzy nie podali swojego udziału wyrażonego w %. Ponadto, istnieje nakładanie się wykonania tych samych czynności przez Habilitanta i inne osoby. Na przykład, w pracy nr 4 (Koro et al., 2016) dr Mydel stwierdził, że jego udział polegał na: „..stworzeniu koncepcji badań, kierowaniu projektem naukowym, w ramach którego realizowano badania i bezpośrednim udziale w realizacji wszystkich prac eksperymentalnych przedstawionych na Figurach 1,2,3,4,5,6,7, analizie wszystkich danych, stworzeniu koncepcji manuskryptu, jego napisaniu i przygotowaniu wszystkich figur.". Tymczasem Prof. J. Potempa napisał, że: „I designed experiments, interpreted data, wrote, revised and proofread the manuscript". Tak więc, dwie osoby twierdzą, że planowały badania i napisały manuskrypt. Dalej, szereg osób wykonywało eksperymenty przedstawione na Rysunkach 1-7 (konkretnie: Koro – dichroizm kołowy, działanie bakteriobójcze, oznaczenie lizy, oznaczenia związane z hMDM (i. e. makrofagami), Scavenius – spektrometrię mas, Rąpała-Kozik i Klaga – rezonans plazmonowy, Hellvard – oznaczenie lizy). Wykonawcy niewątpliwie przedstawiali swoje wyniki w formie graficznej, czyli przygotowywali pierwotne wersje wykresów zamieszczonych na Rys. 1-7. Tymczasem dr Mydel stwierdził, ze przygotował wszystkie rysunki. Finalne wersje rysunków mogły być wykonane przez dr Mydela lecz, moim zdaniem, należało uściślić jego udział w tym zakresie.

Podobna uwaga odnośnie ilustracji dotyczy pozostałych prac, gdzie dr Mydel również stwierdził, że przygotował wszystkie rysunki, podczas gdy:

W pracy nr 2: Dahl-Knudsen i Scavenius wykonali spektrometrię mas, Bielecka – oznaczanie wiązania dopełniacza, Koro – oznaczenia ilościowe modyfikacji i proteolizy IgG, Hellvard – oznaczenie CDC i ADCC, Binder – western blotting;

W pracy nr 3: Koro, Hellvard i Bergrum – wykonały/li testy ELISA, Solheim - analizę statystyczną;

W pracy nr 1: Hazen, Wang – wykonali spektroskopię mas, Hellvard – doświadczenia na zwierzętach, Brisslert – cytometrię przepływową.

Wykonawcy doświadczeń musieli przygotować pierwotne wersje rysunków bądź ich elementów, jeśli rysunki były składane z kilku części. Zwłaszcza, że szereg z tych osób posiadało stopień doktora lub profesora, czyli były to osoby z odpowienim doświadczeniem i umiejętnościami.

Dalej, odnośnie pracy nr 2, Habilitant stwierdził, ze jego udział polegał na: „...przygotowaniu koncepcji manuskryptu, jego napisaniu i...". Jednoczesnie prof. A. Blom napisała, że: „I designed experiments, interpreted results, drafted and proofread the manuscript". Wydaje sie więc, że koncepcja i napisanie manuskrypu były dziełem wspólnym a nie – wyłącznie dr Mydela.

Wyjaśnienie tych spraw przez dr Mydela byłoby wskazane w czasie spotkania Komisji powołanej do oceny Jego osiągniecia i dorobku naukowego.

W skład dorobku naukowego Habilitanta po doktoracie wchodzi 18 opublikowanych oryginalnych eksperymentalnych prac twórczych, z czego 4 zostały przedstawione jako osiągniecie naukowe. Pozostałe ukazały się w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym (*Rheumatology* – 1 praca, *J. Innate Immun* - 1 praca, *NAR* – 1 praca, *Arthritis Rheumatol* – 2 prace , *Mediators Inflamm* – 1 praca, *Sci Rep* – 1 praca, *J Infect Dis* – 1 praca, *Eur J Immun* - 1 praca, *Antimicrob Agents Chemother* – 1 praca, *PLoS Pathog* – 2 prace, *Neurosignals* – 1 praca, *Arthritis Res Ther* – 1 praca, *J. Biol. Chem* – 1 praca, *Micr Pathog* -1 praca). Ponadto, w skład dorobku pana dr Mydela wchodzą 2 prace przeglądowe (w *Curr Rheumatol Rep* oraz *Clin Exp Rheumatol*), 1 rozdział w anglojęzycznej monografii oraz artykuł dotyczący nagrody Nobla przyznanej w 2013 roku. Dodatkowo, dr Mydel prezentował swoje wyniki na 16 konferencjach naukowych. Należy zwrócić uwagę na intensywny wzrost aktywności publikacyjnej po doktoracie: w okresie przed obroną pracy doktorskiej Habilitant opublikował 2 prace naukowe, natomiast po doktoracie, w ciągu 10 lat ukazały się 24 prace. Całą karierę naukową pana dr Mydela cechuje szybkie tempo.

Ta część dorobku naukowego Habilitanta, która nie została włączona do Osiągnięcia, dotyczy głównie badań nad etiologią oraz leczeniem przewlekłego stanu zapalnego i chorób zakaźnych. Są to badania wielowątkowe, co jest związane z tym, że dr Mydel w czasie swojej kariery naukowej pracował w kilku zespołach i współprace te były na ogół kontynuowane po zmianie miejsca pracy. I tak, bezpośrednio po doktoracie, Habilitant pracował w Boston School of Medicine and Dentistry, Boston, USA. Następnie związał się kolejno z dwoma ośrodkami w Szwecji, mianowicie z Uniwersytami w Bergen i Goteborgu; w tym ostatnim zatrudniony jest do dzisiaj.

Jeden z wątków badawczych dotyczył roli modyfikacji potranslacyjnych w etiologii i terapii chorób zakaźnych oraz chorób związanych z przewlekłym stanem zapalnym. Badania te związane były z cytrulinacją i pyroglutaminacją białek (*Sci Rep.* 5, 11969, 2015; *PLoS Pathog.* 9, e1003627, 2013; *J. Infect Dis.* 207, 768, 2013). Tematyka ta jest blisko związana z problemami poruszanymi w pracach przedstawionych jako osiągnięcie badawcze. Między

innymi, w ramach tych badań scharakteryzowano strukturę i mechanizm działania deiminazy peptydyloargininowej, czynnika wirulencji patogennej bakterii *Porphyromonas gingivalis*, odpowiedzialnej za cytrulinację białek gospodarza.

Zainteresowania dr Mydela dotyczyły także charakterystyki Zespołu Sjogrena i poszukiwania dobrego biomarkera tej choroby (*Rheumatology*/kew013, 2016; *Arthritis Rheumatol.* 67, 1084 (2015); *Clin Exp Rheumatol.* 34, 133, 2016. Efektem tych badań było między innymi ustalenie związku pomiędzy proteomem śliny a pierwotnym Zespołem Sjogrena.

Równolegle prowadzone były prace nad molekularnymi mechanizmami rozwoju stanu zapalnego, w tym nad rolą enzymów proteolitycznych, cząsteczek sygnałowych receptorów, czynników transkrypcyjnych oraz środowiskowych wpływających na procesy zapalne. Ten cykl badań zaowocował 10 pracami opublikowanych w latach 2007 - 2015 w prestiżowych czasopismach. Za najważniejsze osiągnięcia naukowe przedstawione w tym cyklu uważam: (1) wykrycie, że w efekcie cięcia lamininy 5 przez elastazę neutrofili wytwarzane są peptydy chemotaktyczne dla neutrofili (*J Biol Chem* 283, 9513 (2008); (2) opisanie roli gingipain w rozwoju zachłystowego zapalenia płuc (*J. Innate Immun.* 000441724, 2015); (3) zbadanie roli białka RPTPα (α-- fosfatazy receptorów tyrozynowych) synowiocytów w sygnalizacji komórkowej i stymulowaniu rozwoju RZS u myszy (*Arthritis Rheumatol*/39442, 2015).

W podsumowaniu stwierdzam, że badania z udziałem pana dr Piotra Mydela w znaczący sposób pogłębiły zrozumienie przyczyn i mechanizmu powstawania procesu zapalnego a także etiologii chorób o podłożu autoimmunologicznym, w tym reumatoidalnego zapalenia stawów i Zespołu Sjogrena. Poza aspektami poznawczymi, wyniki badań, w których uczestniczył Habilitant, mają aspekt praktyczny i mogą mieć znaczenie w opracowaniu testów diagnostycznych w chorobach z chronicznym przebiegiem stanu zapalnego.

Należy odnotować, że dr Piotr Mydel uzyskał ostatnio grant Sonata Bis z NCNu oraz jest koordynatorem i liderem grupy badawczej na Uniwersytecie w Bergen w projekcie finansowanym przez Komisję Europejską.

W podsumowaniu uważam, że zarówno osiągniecie naukowe, jak i całokształt dorobku naukowego pana dr Piotra Mydela uzasadniają nadanie Mu stopnia doktora habilitowanego Nauk Biologicznych w dyscyplinie Biochemia.

KIEROWNIK
Katedry Biochemii Ogólnej i Medycznej
prof. dr hab. Barbara Lipińska