INSTYTUT Instytut Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi

BioIMed

93-232 Łódź
ul. Lodowa 106

tel.: 042 2723610
fax.:042 2723630

e-mail: abrzostek@cbm.pan.pl
www.cbm.pan.pl

7 czerwca 2019r.

Dr hab. Anna Brzostek
Pracownia Genetyki i Fizjologii Mycobacterium
Instytut Biologii Medycznej PAN, Łódź

Ocena pracy doktorskiej **mgr Izabeli Ciastoń nt.**
„Niezależna od aktywności proteolitycznej rola biologiczna gingipain *Porphyromonas gingivalis* w regulacji układu odpornościowego".

Praca doktorska Pani mgr Izabeli Ciastoń została wykonana w Zakładzie Mikrobiologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem Dr hab. Joanny Kozieł, prof. UJ. Badania poznawcze niniejszej rozprawy zostały sfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki, w ramach projektu Preludium 11, nt. *„Nowy nieenzymatyczny mechanizm działania gingipain, głównych czynników wirulencji bakterii Porphyromonas gingivalis"*, realizowanego w latach 2016-2019, którego kierownikiem była Doktorantka, a także w ramach projektu dla doktorantów Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ pt. *„Modulacja szlaku ekspresji IL-6 w komórkach dendrytycznych przez gingipainę HRgpA"* i programu KNOW.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi starannie opracowaną monografię obejmującą 170 stron. Część teoretyczna rozprawy uzupełniona jest streszczeniem pracy zamieszczonym zarówno w języku polskim, jak i angielskim. Układ tekstu rozprawy doktorskiej Pani mgr Izabeli Ciastoń jest tradycyjny, część doświadczalna jest poprzedzona dobrze napisanym wstępem literaturowym, obrazującym obecny stan wiedzy na temat chorób przyzębia, czynników ryzyka, roli układu immunologicznego w rozwoju paradontozy, cytokin zaangażowanych w proces choroby, a na zakończenie Doktorantka opisuje drobnoustroje odpowiedzialne za rozwój paradontozy zwracając uwagę na *Porphyromonas gingivalis*, kluczowego drobnoustroju w patogenezie chorób przyzębia. Ostatni podrozdział Wstępu, poświęcony jest aktualnej wiedzy na temat głównych czynników wirulencji tych bakterii z uwzględnieniem fimbrii, lipopolisacharydu oraz proteaz cysteinowych-gingipain i jest jednocześnie uzasadnieniem podjętej tematyki badawczej. Doktorantka wspomina, że LPS

INSTYTUT Instytut Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi
BioIMed
93-232 Łódź
ul. Lodowa 106
tel.: 042 2723610
fax.:042 2723630
e-mail: abrzostek@cbm.pan.pl
www.cbm.pan.pl

Porphyromonas gingivalis izolowany od pacjentów z paradontozą ma inną strukturę lipidu A, **czy zatem można przypuszczać, że będzie on odpowiadał za zwiększoną indukcję odpowiedzi zapalnej?**

Prawidłowa mikroflora jamy ustnej w rozwoju parodontozy ulega zmianie w kierunku populacji Gram-ujemnych bakterii beztlenowych tworzących poniżej linii dziąseł biofilm bakteryjny, indukując ciągłą aktywację układu immunologicznego, co prowadzi do jego deregulacji, a w konsekwencji do rozwoju chronicznego stanu zapalnego. Doktoranta opisuje szereg czynników odpowiedzialnych za rozwój paradontozy tj.: palenie papierosów, przyjmowanie leków zmniejszających przepływ śliny, ciągły stres, a także polimorfizmy genów. **W tym miejscu, chciałabym prosić Panią mgr I. Ciastoń o rozwinięcie tematu polimorfizmu genów zaangażowanych w proces paradontozy?**

Bardzo interesującymi w części Wstępu są informacje dotyczące wpływu paradontozy na szereg chorób systemowych i autoimmunologicznych, takich jak: cukrzyca, choroby układu krążenia, reumatoidalne zapalenie stawów, a ostatnio opisano również korelację paradontozy z demencją i rozwojem choroby Alzheimera, przy czym Autorka zwraca uwagę, na fakt, iż *„zastosowanie inhibitorów proteaz P. gingivalis zmniejszyło stan zapalny oraz degenerację neuronów, co może stanowić kluczowy etap w kuracji choroby Alzheimera" (str. 21).* **Proszę Doktorantkę o komentarz odnośnie nieaktywnych form proteaz tych bakterii czy są doniesienia o ich roli w chorobie Alzheimera, czy istnieje możliwość zablokowanie tych nieaktywnych białek?**

Podsumowując, część teoretyczna pracy doktorskiej jest napisana ładnym, przejrzystym językiem naukowym dostarczającym czytelnikowi wszystkich informacji koniecznych dla właściwej oceny pozostałych części pracy. Dobór zagadnień omawianych we „Wstępie" pracy jest również przemyślany i związany z prezentowanymi w dalszych rozdziałach wynikami własnymi Autorki. Należy podkreślić, że rysunki zamieszczone we Wstępie rozprawy są bardzo dobrze dobrane i znaczącą ułatwiają prześledzenie wszystkich zagadnień omawianych przez Panią magister, na szczególne wyróżnienie zasługuje Rys. 4 dotyczący roli odpowiedzi immunologicznej w zapaleniu przyzębia.

Z uwagi na brak precyzyjnych wyjaśnień molekularnego podłoża regulacji ekspresji cytokin prozapalnych, głównie IL-6, przez *P. gingivalis* i jego czynniki wirulencji, zwłaszcza nieaktywne proteolitycznie gingipainy, Doktorantka podjęła się realizacji takiego celu badań. Do realizacji postawionego celu Pani I. Ciastoń wykorzystała model komórek dendrytycznych

93-232 Łódź
ul. Lodowa 106
tel.: 042 2723610
fax.:042 2723630
e-mail: abrzostek@cbm.pan.pl
www.cbm.pan.pl

(moDC) oraz linię ludzkich keratynocytów dziąsłowych TIGKs, a także szczep dziki *P. gingivalis*W83 i dwa jego mutanty ΔKΔRAB i ΔRgpB, jak również oczyszczone preparaty białkowe gingipain. W tym miejscu pragnę zwrócić uwagę, że w tabeli Szczepy bakteryjne (str.46) poza źródłem literaturowym warto zamieścić genotypy mutantów. Na str. 56 Doktorantka ponownie umieściła listę tych samych szczepów wraz z opisem, jednak wciąż trudno zrozumieć czym się charakteryzuje szczep ΔRgpB? Dodatkowo zabrakło informacji o wykorzystanych w badaniach białek gingipain, czy są one dostępne komercyjnie czy zostały oczyszczone przez Doktorantkę samodzielnie? Warto byłoby zamieścić informację o ewentualnej procedurze otrzymania białek w rozdziale Metody?

Cały rozdział „Materiały i Metody" stanowi zbiór szerokiej gamy metod immunologicznych i genetycznych, z którymi Autorka zapoznaje czytelnika. Wszystkie procedury są dokładnie opisane w sposób umożliwiający ich odtworzenie w innym laboratorium. Małym niedociągnięciem jest używanie angielskich wyrażeń w niektórych z opisywanych metod np. str. 52.

Część eksperymentalną rozprawy stanowi 50 stron bardzo wielu, dobrze udokumentowanych wyników. Rozdział Wyniki, autorka rozpoczęła od opisu modelu badawczego, jakim były komórki dendrytyczne różnicowane z monocytów (moDC), poprzez weryfikację wpływu *P. gingivalis* i jego wybranych czynników wirulencji na odpowiedź układu immunologicznego manifestującą się produkcją cytokin prozapalnych i aktywacją procesu różnicowania limfocytów pomocniczych. Bardzo dobrym modelem badawczym *in vitro* w prezentowanych badaniach wydaje się być unieśmiertelniona linia komórkowa TIGKs, która wykazuje cechy pierwotnych keratynocytów dziąsłowych, a dodatkowo zapewnia powtarzalność wyników poprzez zachowanie fenotypu komórek pierwotnych niezależnie od dawcy. Następnie Doktorantka ocenia wpływ czynników wirulencji *P. gingivalis* tj. LPS, białko FimA oraz arginino-i lizyno-specyficznych gingipain na produkcję i ekspresję IL-6, cytokiny ważnej z punktu widzenia degeneracji kości u osób z parodontozą, wykazując że arginino-specyficzna gingipaina- RgpAw największym stopniu indukuje tę cytokinę prozapalną i co istotne ekspresja genu dla IL-6 negatywnie koreluje z aktywnością proteolityczną białka. Zatem poczynione przez Doktorantkę obserwacje wskazujące na udział nieaktywnych gingipain w rozwój odpowiedzi prozapalnej uprawniają do dalszych poszukiwań mechanizmu ich działania.

INSTYTUT
BioIMed
Instytut Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk
w Łodzi
93-232 Łódź
ul. Lodowa 106
tel.: 042 2723610
fax.:042 2723630
e-mail: abrzostek@cbm.pan.pl
www.cbm.pan.pl

Doktorantka badając wpływ warunków hodowli na aktywność gingipain zaobserwowała bardzo silne zahamowanie ich aktywności w obecności surowicy wołowej zarówno przy inkubacji komórek szczepu dzikiego, jak i białka RgpA. **Czy mogłaby Pani wyjaśnić dlaczego surowica FSB ma takie właściwości?** Ciekawą obserwacją jest wzrost ekspresji genu IL-6 oraz wzrost produkcji tej cytokiny indukowany jednoczesną stymulacją nieaktywnym białkiem RgpA, FimA i LPS (Rys.14). **Czy obserwowany efekt nie pochodzi od samej nieaktywnej gingipainy RgpA? Czym można tłumaczyć taki wynik? Czy badane białka mają zdolność wzajemnych oddziaływań?**

Powyższe pytania pojawiają się w związku z wynikami zwiększonej ekspresji genu dla IL-6, mierzonej ilością transkryptów, uzyskanymi dla komórek dendrytycznych infekowanych szczepami *P. gingivalis*, odpowiednio mutantem delecyjnym pozbawionych aktywności wszystkich gingipain cysteinowych i szczepem dzikim W83 z dodatkiem inhibitorów proteaz KYT (Rys.15).

W dalszych etapach badań Doktorantka skrupulatnie wyjaśnia prozapalne działanie aktywnych i nieaktywnych enzymatycznie gingipain poprzez pomiar ekspresji genów dla innych cytokin prozapalnych z wykorzystaniem zarówno komórek dendrytycznych, jak i komórek nabłonkowych TIGKs, zwracając uwagę na ekspresję cytokin prozapalnych przy udziale nieaktywnej gingipainy RgpA w komórkach TIGKs i celowość analizy ścieżki sygnału komórkowego indukowanej tą proteazą. W **tym miejscu chciałabym poprosić Doktorantkę o wyjaśnienie dotyczące „delecyjnego szczepu ΔRgpB z dodatkową mutacją... skutkującą produkcją nieaktywnej gingipainy RgpA" użytego do powyższych analiz?**

Przystępując do poszukiwania ścieżki sygnału wykonano badania zmierzające do określenia interakcji gingipain z błoną komórkową gospodarza wykorzystując techniki mikroskopii fluorescencyjnej, co pozwoliło na ich umiejscowienie w obszarze tratw lipidowych, a następnie podejmując próbę bezpośredniej identyfikacji receptora błonowego wiążącego nieaktywne gingipainy z wykorzystaniem spektrometrii mas i sieciowania chemicznego. Otrzymane wyniki pozwoliły na identyfikację kilku potencjalnych białek receptorowych, jednakże nie dały jednoznacznej odpowiedzi na temat białka błonowego, oddziałującego bezpośrednio z nieaktywną gingipainą. Stąd w kolejnym etapie podjęto próbę pośredniej identyfikacji szlaku sygnałowego w komórkach gospodarza indukowanego nieaktywną gingipainą, w którym jako model badawczy wykorzystano zwiększoną ekspresję IL-6.

INSTYTUT Instytut Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi
BioIMed
93-232 Łódź
ul. Lodowa 106
tel.: 042 2723610
fax.:042 2723630
e-mail: abrzostek@cbm.pan.pl
www.cbm.pan.pl

Udowodniono zaangażowanie szlaku PI3K/AKT w przekaz sygnału od nieaktywnej gingipainy poprzez zastosowanie odpowiedniego inhibitora i analizy aktywacji kluczowego białka tego szlaku –AKT, a w kolejnych etapach pracy udowodniono udział gingipain w procesie różnicowania naiwnych limfocytów CD4+ w subpopulację Th17, poprzez ocenę ekspresji genów dla cytokin prozapalnych związanych z tą populacją limfocytów, zwracając uwagę na fakt, że różnicowanie CD4+ do fenotypu Th17 jest uzależnione od aktywności proteolitycznej badanych gingipain. Z kolei z danych literaturowych wiadomo, że powstawanie limfocytów Th17 jest ściśle związane z obecnością interleukiny 6 w środowisku stanu zapalnego. Zablokowanie tej cytokiny korelowane jest z obecnością populacji Th17, a tym samym jest to wskazówką, aby metodę blokowania tej cytokiny wprowadzić do ogólnej terapii paradontozy.

Dyskusja pracy została napisana bardzo dojrzale, ze znakomitą znajomością tematu, a Doktorantka w sposób krytyczny odnosi uzyskane przez siebie wyniki do danych literaturowych, jednocześnie podkreślając swój wkład naukowy w rozwój podjętej tematyki badań. Zwieńczeniem Dyskusji są graficznie przedstawione proponowane mechanizmy działania gingipain w kontekście prezentowanych wyników, a Wnioski wyciągnięte przez Doktorantkę są w pełni uprawnione.

W tekście rozprawy zauważono nieliczne, drobne błędy językowe, redakcyjne i niepoprawne sformułowania.

Na zakończenie chciałabym poprosić Panią mgr I. Ciastoń o podzielenie się podczas publicznej obrony spostrzeżeniami na temat:

- Czy uważa Pani, że deplecja cholesterolu obecnego w tratwach lipidowych mogłaby wpłynąć na zmiany w szlaku przekazywania sygnału dla nieaktywnych gingipain?
- Czy zostały zidentyfikowane receptory błonowe zlokalizowane w tratwach lipidowych dla innych wewnątrzkomórkowych patogenów?

Podsumowanie:

Po szczegółowym zapoznaniu się z pracą doktorską Pani mgr Izabeli Ciastoń uważam, że przedstawiona do oceny praca zawiera oryginalne i bardzo wartościowe wyniki co wpływa na moją wysoką ocenę osiągnięć Pani mgr Izabeli Ciastoń, a zawarte pytania, wątpliwości nie wpływają w najmniejszym stopniu na bardzo pozytywną ocenę pracy. Jednocześnie stwierdzam,

INSTYTUT
BiolMed
Instytut Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk
w Łodzi
93-232 Łódź
ul. Lodowa 106
tel.: 042 2723610
fax.:042 2723630
e-mail: abrzostek@cbm.pan.pl
www.cbm.pan.pl

że przedstawiona mi do recenzji Rozprawa Doktorska spełnia warunki określone w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) z dnia 14 marca 2003 r z późniejszymi zmianami i wnoszę do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.