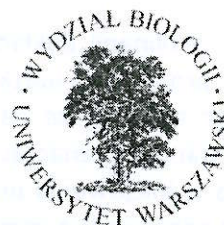




UNIwersyTET  
WARszAWSKI

Wydział Biologii  
Instytut Mikrobiologii  
Zakład Genetyki Bakterii  
dr hab. Renata Godlewska



Warszawa, 6 września 2023

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Aleksandry Wielento, pt.**

**A novel mechanism of manipulation of the host immune response by *Porphyromonas gingivalis*:**

**The role of PPAD and fimbriae in TLR2-dependent signaling**

**wykonanej w Zakładzie Mikrobiologii, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego,**

**pod kierunkiem prof. dr. hab. Jana Potempy oraz: dr. Aleksandra Grabca**

1. **Wartość naukowa rozprawy**

a. **Oryginalność badań:**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana w języku angielskim w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów, składającego się z dwóch oryginalnych publikacji oraz jednego rozdziału zawierającego nieopublikowane wyniki. W obu publikacjach Kandydatka jest pierwszą autorką i jej udział w ich powstaniu jest wiodący. Badania dotyczą *Porphyromonas gingivalis*, jednego z najważniejszych patogenów jamy ustnej, odpowiedzialnego za rozwój i postęp przewlekłego zapalenia przyzębia, co w konsekwencji może spowodować utratę zębów, a także jest powiązane z różnymi chorobami ogólnoustrojowymi, takimi jak reumatoidalne zapalenie stawów, choroby sercowo-naczyniowe czy choroba Alzheimera. Praca koncentruje się na badaniu wpływu cytrulinowanych białek budujących fimbrie *P. gingivalis* na szlaki przekazywania sygnału w komórce eukariotycznej zależne od TLR2. Część cząsteczka TLR2 jest częścią złożonego systemu rozpoznawania struktur powierzchniowych i wewnętrznych drobnoustrojów (tzw. wzorców molekularnych) i rozpoznaje m.in. fimbrie *P. gingivalis*. Aktywacja TLRów uruchamia produkcję chemokiny, interferonów (IFN), cytokin prozapalnych, ale także przeciwzapalnych. U podstawy przedstawionej rozprawy leży obserwacja, poczyniona w zespole kierowanym przez prof. Jana Potempę – promotora rozprawy, że niezdolne do cytrulinacji szczepki *P. gingivalis*, z mutacją w genie kodującym deiminazę peptydyloargininową (PPAD), nie stymulują odpowiedzi prozapalnej bądź stymulują ją znacznie słabiej i nie aktywują szlaku syntezy prostalandyiny E2 (PGE2) - czynnika prozapalnego, powodującego resorpcję kości w zapaleniu przyzębia.

Badania przeprowadzone przez Doktorantkę doprowadziły do konkluzji, że aktywacja TLR2 jest

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa  
tel.: 22 55 41 321, faks: 22 55 41 402  
e-mail: r.godlewska@uw.edu.pl  
<http://www.biol.uw.edu.pl>

zależna od cytrulinacji, dokładniej od cytrulinowanych fimbrii *P. gingivalis*, a ich obecność wzmacnia odpowiedź prozapalną ludzkich makrofagów aktywując ekspresję genów szlaku syntezy PGE2 i cytokin oraz sprawia, że bakterie lepiej przeżywają w makrofagach. Wyniki przedstawione w dysertacji stanowią znaczący i oryginalny wkład w wyjaśnienie roli cytrulinowanych białek *P. gingivalis* w inicjowaniu procesu zapalnego oraz rzuca trochę światła na sposób w jaki patogen manipuluje odpowiedzią immunologiczną gospodarza.

#### b. Wartość naukowa rozdziałów/artykułów:

Dwie prace będące podstawą ocenianej rozprawy doktorskiej ukazały się w naukowych czasopismach o międzynarodowym zasięgu, które znajdują się w bazie Journal Citation Report, a także na liście punktowanych czasopism MEiN. Są to czasopisma: *Frontiers in Immunology*, współczynnik wpływu IF=7.3 i 140 pkt. MEiN oraz *Molecular Oral Microbiology*, IF=3.7 i 70 pkt. Dodatkowo Doktorantka zamieściła pozostałe, niepublikowane jeszcze wyniki, które przedstawiła w formie przygotowanego do publikacji manuskryptu.

Głównym, celem opisanych doświadczeń było zbadanie roli cytrulinowanych białek *P. gingivalis* w eukariotycznych szlakach przekazywania sygnału zależnych od aktywacji receptora TLR2. Badania opisane w pierwszej pracy doprowadziły do wniosku, że zarówno obecność enzymu przeprowadzającego cytrulinację czyli PPAD jak i fimbrii jest konieczna do aktywacji receptora TLR2 i stymulacji odpowiedzi immunologicznej.

Doktorantka zbadła zdolność do aktywacji TLR2 różnych szczepów *P. gingivalis* oraz ich izogenicznych mutantów w genach kodujących główną podjednostkę fimbrii – *fimA* oraz w genie *ppad*. Dowiodła, że całe komórki bakteryjne jak również ich sonikaty w równym stopniu indukują aktywność TLR2, co świadczy o tym że ligand dla receptora znajduje się na powierzchni komórki bakteryjnej. W eksperymentach użyto eleganckiego modelu badawczego: ludzkiej linii komórek glejaka złośliwego U251MG transfekowanej trzema wektorami: (1) niosącym system reporterowy zawierający gen lucyferazy pod kontrolą elementów reagujących na NFkB, (2) zawierającym gen  $\beta$ -galaktozydazy pod kontrolą czynnika EF-1 $\alpha$  oraz (3) kodującym ludzki receptor TLR2 lub heterodimery TLR2-TLR1/TLR2-TLR6. Sama, nietransfekowana linia U251MG nie wykazuje ekspresji TLR2. W takim układzie doświadczalnym można zbadać efekt pobudzenia receptora TLR2 w odpowiedzi na infekcję różnymi szczepami *P. gingivalis*, a aktywacja TLR2 manifestuje się poprzez bioluminescencję komórek. Aktywację TLR2 badano także przy użyciu komercyjnej linii ludzkich komórek HEK-Blue hTLR2, które otrzymano przez kotransfekcję ludzkich genów TLR2 i SEAP (wydzielana embrionalna fosfataza alkaliczna) do komórek HEK293. Ekspresja genu fosfatazy jest także zależna od aktywacji NFkB. Wyniki otrzymane przy użyciu obu linii komórkowych były zbieżne i jednoznacznie potwierdziły, że *P. gingivalis* indukuje odpowiedź immunologiczną za pośrednictwem receptora TLR2, a aktywacja TLR2 zależy od ekspresji i aktywności PPAD oraz od obecności cytrulinowanych fimbrii. Otrzymane rezultaty Doktorantka potwierdziła także przeprowadzając analogiczne doświadczenia przy użyciu ludzkich pierwotnych fibroblastów skóry (PHGFs) uzyskanych od zdrowych ochotników.

Autorzy pracy zakładali, że białko budujące fimbrie FimA, jest cytrulinowane i ta modyfikacja jest kluczowa dla aktywacji TLR2. W dyskusji napisano, że nie udało się skomplementować braku deiminazy peptydyloargininowej poprzez dodanie czystego enzymu do podłoża, w którym hodowano bakterie z mutacjami w genie *ppad*. Takie działanie nie spowodowało cytrulinacji fimbrii i aktywacji TLR2.

W drugiej publikacji wykazano zaś, że wbrew wcześniejszym przypuszczeniom, to nie główne białko budujące fimbrie, FimA jest modyfikowane przez PPDA. Autorzy postulują, że cytrulinacji podlegają białka towarzyszące, znajdujące się na końcu fimbrii, tj. Fim C/D/E (choć przedstawione dowody są pośrednie) i to te białka są kluczowe w procesie aktywacji TLR2.

W pracy tej wykazano także, że profile ekspresji genów komórek PHGFs infekowanych szczepami *P. gingivalis* z nieaktywną deiminazą peptydyloargininową oraz niewytwarzającymi fimbrii są bardzo do siebie podobne, ale znacząco różne od profilu komórek zakażonych szczepem ATCC33277 produkującym cytrulinowane fimbrie, co także potwierdza rolę tych struktur w aktywacji odpowiedzi immunologicznej.

Mam tu kilka pytań do Doktorantki. Skoro potencjalnie cytrulinowana arginina w FimA jest odcinana od głównej części białka, a więc nie ma jej w strukturze fimbrii, to dlaczego spodziewała się Pani, że to właśnie FimA jako podstawowe białko strukturalne fimbrii podlega modyfikacji przez PPAD? Czy wiadomo co się dzieje z tymi odciętymi przez gingipainę „końcówkami” FimA i czy pełnią jakąś rolę? Czy w białkach FimC/D/E występują potencjalne miejsca cytrulinacji, czyli reszty argininy na końcu dojrzałego białka? W których miejscach białka te są cięte przez gingipainy? Czy planowane są jakieś eksperymenty, które w bezpośredni sposób udowodnią, że FimC/D/E podlegają cytrulinacji? Chciałabym się też dowiedzieć dlaczego użyto tylko mutantów *P. gingivalis*  $\Delta fimC$  i  $\Delta fimE$ , bez mutantu  $\Delta fimD$ ? I na koniec taka moja refleksja: wydaje mi się, że nie można całkowicie odrzucać roli białka FimA w procesie aktywacji TLR2. Brak FimA oczywiście skutkuje brakiem fimbrii, co powoduje brak stymulacji receptora eukariotycznego. Jednakże badania z udziałem punktowego mutantu *fimA* R46A, wykazały że tak zmienione FimA nie jest w stanie polimeryzować, a więc jeśli dobrze rozumiem, ustrukturyzować się w fimbrie (Fig.3 E), a mimo to szczep taki aktywuje TLR2 na tym samym poziomie co szczep dziki (Fig.3 B). Czy ma Pani jakiś pomysł jak wyjaśnić ten fakt?

Mam też spostrzeżenie dotyczące użytych mutantów. Nishiyama wraz z współpracownikami w publikacji z 2007 roku, w której wykorzystali te same mutanty co Doktorantka, dowodzą, że geny *fimCDE* tworzą operon i mutacja w pierwszym genie operonu (*fimC*) skutkuje efektem polarnym, a co za tym idzie brakiem pozostałych dwóch białek. Podobny wpływ ma mutacja w *fimD* – białko FimC powstaje, ale oprócz FimD brak jest też FimE. Jedynie mutacja w *fimE* nie wpływa na ekspresję białek C i D. Mutacja w *fimC* jest mutacją typu „wszystko albo nic”. Czy nie warto byłoby więc zbadać które z tych białek jest kluczowe, np. komplementując brak poszczególnych białek? Czy istnieją przypuszczenia co dzieje się z tymi białkami w przypadku braku FimA, a co za tym idzie braku ustrukturyzowanych fimbrii? Czy pozostają one związane z powierzchnią komórki bakteryjnej czy raczej zostają uwolnione do środowiska? W jaki sposób dochodzi wtedy do aktywacji TLR2?

W ostatniej części pracy, zawierającej nieopublikowane dotąd wyniki, wykazano że odpowiedź prozapalna ludzkich makrofagów, manifestująca się m.in. wzrostem wydzielania cytokin, jest znacząco nasiloną w komórkach infekowanych szczepami *P. gingivalis* produkującymi cytrulinowane fimbrie w porównaniu komórek infekowanych szczepami niewytwarzającymi fimbrii, bądź szczepami niezdolnymi do cytrulinacji białek. Wykazano także, że przeżycie bakterii w makrofagach zależy od aktywności PPAD i modyfikacji przez ten enzym białek akcesorowych fimbrii. Czy Doktorantka ma jakieś wytłumaczenie dla niejednoznacznych wyników dotyczących poziomu ekspresji genu kodującego mikrosomalną syntazę PGE2 (mPGES-1), tj. stosunkowo wysokiego poziomu ekspresji tego genu po potraktowaniu ludzkich makrofagów pochodzących z monocytów krwi obwodowej szczepem *P. gingivalis* z mutacją w *fimE*?

I na koniec ogólne pytanie: czy znane są przypadki zakażeń mieszanych, kilkoma różnymi szczepami *P. gingivalis*? Skoro osoby z najcięższym przebiegiem infekcji są zakażone zwykle szczepami

prezentującymi FimA typu II bądź IV, zaś to typ I najsilniej aktywuje receptory TLR2, to może mamy do czynienia z zakażeniami mieszanymi lub z większym znaczeniem typów FimCDE, albo z jeszcze innymi nieokreślonymi czynnikami wirulencji?

## 2. Wartość merytoryczna rozprawy

*(umiejętność wprowadzenia w tematykę badawczą i jasność sformułowanych hipotez badawczych, dobór metod badawczych i narzędzi statystycznych do analizy danych, sposób przedstawienia wyników, krytyczna analiza wyników i umiejętność ich interpretacji na tle literatury przedmiotu, jasność i poprawność wniosków):*

Rozprawa zawiera niezbyt obszerne, ale wystarczające wprowadzenie do tematyki badawczej, w którym mowa jest o zapaleniu przyzębia jako jednostce chorobowej, roli *P. gingivalis* z uwzględnieniem czynników wirulencji w jej rozwoju. Ponadto omówiono funkcję i związek receptora TLR2 z wywołaniem odpowiedzi immunologicznej na zakażenie *P. gingivalis*. Bardzo dobrym pomysłem było także przedstawienie w tej części pracy użytych modeli badawczych, co jest wielkim ułatwieniem, zwłaszcza dla kogoś kto niezbyt często pracuje z liniami komórkowymi. Zabrało mi trochę szerszego opisanie fimbrii *P. gingivalis*, proponowanego mechanizmu ich składania, sposobu procesowania białek budujących tę strukturę. Hipoteza badawcza rozprawy oraz zadania mające doprowadzić do jej weryfikacji zostały klarownie sformułowane. Do realizacji tych zadań Doktorantka zastosowała szereg adekwatnych i zróżnicowanych metod, opisanych w załączonych artykułach. Na ich podstawie można stwierdzić, że Pani A. Wielento opanowała różnorodny i nowoczesny warsztat badawczy, na który składają się podstawowe metody (1) mikrobiologiczne związane z hodowlą bakterii, ale także izolacją fimbrii i pęcherzyków zewnątrz błonowych (OMVs), (2) metody genetyczne i molekularne – ilościowy PCR (qPCR), mutageneza, RNA-Seq, analizy białek, (3) biochemiczne (badanie aktywności PPAD, test immunoenzymatyczny (ELISA)), (4) statystyczne oraz metody związane z pracą z różnymi liniami komórkowymi. Nie ma uwag do sposobu przedstawienia wyników i oraz ich analizy. Ta część została już pozytywnie oceniona przez recenzentów z czasopism w których opublikowano 2 artykuły będące podstawą dysertacji. W podsumowującej pracę *Dyskusji*, obejmującej 10 stron maszynopisu, Doktorantka przeprowadziła dokładną analizę uzyskanych wyników i krytycznie je omówiła, uwzględniając rezultaty innych badaczy, których prace zacytowała (133 pozycje). Ten rozdział zasługuje na szczególną uwagę, gdyż stanowi rzetelne i kompleksowe podsumowanie całej pracy. Na końcu, na podstawie uzyskanych rezultatów, Autorka sformułowała wnioski końcowe, które uważam za merytorycznie poprawne.

## 3. Poprawność redakcyjna rozprawy

*(układ pracy, jasność stylu, szata graficzna itp.):*

Rozprawa jest poprawnie skonstruowana i uwzględnia wszystkie zalecenia Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne na UJ dotyczące dysertacji przygotowywanych w formie spójnego tematycznie zbioru opublikowanych artykułów. Zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim, 10-stronicowy wstęp zawierający podstawowe informacje niezbędne do zrozumienia istoty problemu badawczego, opis modelu badawczego oraz dobrze sformułowane cele, hipotezę badawczą i listę zadań badawczych, które miały doprowadzić do weryfikacji hipotezy. Autorka dołączyła dwa artykuły naukowe wraz z niezbędnymi oświadczeniami współautorów określającymi ich indywidualny procentowy wkład. Wkład Doktorantki w ich powstanie został oceniony na poziomie 60%. Zbiór został rozszerzony o wyniki dotychczas nieopublikowane, które także zostały przedstawione w

formie manuskryptu z typowym układem podrozdziałów: Introduction, Methods, Results, Discussion oraz listą współautorów wraz z afiliacjami. Taka forma wskazuje, że wyniki te są przygotowywane do publikacji, a lista autorów sugeruje, że badania były przeprowadzone przy współudziale kilku badaczy. Uważam więc, że pomimo informacji w nagłówku, że są to wyniki nieopublikowane, doktorantka powinna zamieścić oświadczenia współautorów lub informację o charakterze ich udziału, ponieważ w przeciwnym razie nie ma możliwości oceny jej wkładu w przeprowadzone badania.

#### 4. Uwagi krytyczne

Uwagi merytoryczne zamieściłam powyżej, więc w tym miejscu uwzględniam kilka drobnych uwag krytycznych, dotyczących głównie strony redakcyjnej:

- a) Na rycinie S2 umieszczonej w materiałach dodatkowych publikacji nr 2 są kompletnie pomyłone podpisy
- b) Na str. 73 (8 wers od góry) znajduje się niedokończone zdanie, urwane na słowach *induction of*
- c) W kilku miejscach brak jest kursywy w zapisie nazwy gatunkowej *P. gingivalis*

#### 5. Ocena końcowa:

Podsumowując stwierdzam, że badania przedstawione w recenzowanej rozprawie są nowatorskie, wykonane z zastosowaniem odpowiednio dobranych metod, a sama rozprawa stanowi spójną merytorycznie całość i zasługuje na wysoką ocenę. Tematyka badań jest interesująca i potrzebna ze względu na znaczenie *Porphyromonas gingivalis* w chorobach przyzębia oraz powiązaniach tego mikroorganizmu z występowaniem innych, ogólnoustrojowych chorób. Zrozumienie mechanizmów patogenezы oraz manipulacji odpowiedzią odpornościową może przyczynić się do opracowania w przyszłości nowych strategii eradykacji patogena i skuteczniejszego leczenia chorób przez niego wywoływanych.

Ja, niżej podpisana stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska **mgr Aleksandry Wielento** spełnia warunki określone w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie **mgr Aleksandry Wielento** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

TAK/NIE

Ja, niżej podpisany wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej. Uzasadnienie wniosku (25-200 słów)

TAK/NIE

06.09.2023.....

data sporządzenia recenzji

  
.....  
podpis recenzenta