



UNIwersytet Medyczny Im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

Kierownik: Dr hab. n. med. Tomasz M. Karpiński, Prof. UM

ul. Rokietnicka 10
60-806 Poznań

tel.: 61 641-85-55
e-mail: tkarpin@ump.edu.pl

Poznań, 14.08.2023.

Recenzja

rozprawy 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”

przygotowanej pod kierunkiem Prof. dr hab. Jana Potempy

i Dr Aleksandra Grabiec

w Zakładzie Mikrobiologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii

Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr Aleksandry Wielento stanowi spójny tematycznie cykl trzech publikacji. Dwa artykuły zostały opublikowane w czasopiśmie i posiadają łączny IF = 11. Trzeci artykuł oczekuje na publikację. Temat pracy doktorskiej jest niezwykle istotny, ponieważ przedstawia wpływ cytrulinomu periopatogenu *Porphyromonas gingivalis* na komórki gospodarza. *P. gingivalis* jest powszechnie występującym beztlenowcem jamy ustnej, mającym wpływ na rozwój chorób przyzębia, zapalenia stawów, miażdżycy i nowotworów układu pokarmowego. Opisany w pracy doktorskiej nowy mechanizm związany z cytrulinacją białek wskazuje, że *P. gingivalis* może manipulować odpowiedzią immunologiczną gospodarza. Odkrycie to może mieć znaczenie w opracowaniu nowych metod leczenia i profilaktyki chorób wywołanych przez *P. gingivalis*.

Rozprawa doktorska obejmuje streszczenie w języku angielskim i polskim, wprowadzenie, cele badawcze pracy, wyniki i dyskusję. Dodatkowo, załączono kopie publikacji oraz oświadczenia współautorów.

Na wstępie chciałbym podkreślić walory ocenianej rozprawy doktorskiej, w tym umiejętność wykorzystania przez Doktorantkę wielu metod badawczych, w tym hodowli komórkowych, przygotowania mutantów, izolacji fimbrii, izolacji RNA, ilościowego PCR, badań reporterowych, Western blotting, ELISA i sekwencjonowania. Dodatkowo, wyniki zostały prawidłowo opisane i bardzo dobrze zilustrowane, a prowadzona przez Autorkę dyskusja wskazuje na jej świetną orientację w badanym zagadnieniu. Uważam, że wpłynęło to na uzyskanie wyników o znaczeniu światowym.

W skład rozprawy doktorskiej wchodzi następujące artykuły:

1. Wielento A, Bereta GP, Łagosz-Ćwik KB, Eick S, Lamont RJ, Grabiec AM, Potempa J. TLR2 activation by *Porphyromonas gingivalis* requires both PPAD activity and fimbriae. *Front Immunol.* 2022;13:823685. doi: 10.3389/fimmu.2022.823685.
2. Wielento A, Bereta GP, Szczęśniak K, Jacuła A, Terekhova M, Artyomov MN, Hasegawa Y, Grabiec AM, Potempa J. Accessory fimbrial subunits and PPAD are necessary for TLR2 activation by *Porphyromonas gingivalis*. *Mol Oral Microbiol.* 2023;38(4):334-346. doi: 10.1111/omi.12427.
3. Wielento A, Drapała D, Jacuła A, Hasegawa Y, Bagaitkar J, Grabiec A, Potempa J. Citrullinated *P. gingivalis* accessory fimbriae subunits are novel TLR2 agonists essential for proinflammatory activation and inhibition of bactericidal activity of phagocytes. – niepublikowany.

W pierwszej publikacji Autorka zbadała wpływ deiminazy peptydylargininy *P. gingivalis* (PPAD) na aktywację receptora Toll-podobnego-2 (TLR2), fimbrie i pęcherzyki błony zewnętrznej (OMV) *P. gingivalis*. Jednym z czynników wirulencji *P. gingivalis* jest unikalny enzym PPAD, który przekształca C-końcowe reszty Arg w białkach i peptydach bakteryjnych oraz gospodarza w cytrulinę. PPAD stymuluje odpowiedź prozapalną w fibroblastach dziąseł poprzez aktywację syntezy prostaglandyny E2 (PGE2). W organizmie człowieka *P. gingivalis* jest rozpoznawany głównie przez receptor TLR2. Używając reporterowych linii komórkowych, Doktorantka wykazała, że aktywność PPAD wymagana jest do aktywacji TLR2 przez komórki i OMV *P. gingivalis*. Stwierdziła również, że fimbrie

ze szczepu typu dzikiego (ATCC 33277) stymulują odpowiedź prozapalną w ludzkich fibroblastach dziąsłowych, natomiast fimbrie ze szczepów z niedoborem PPAD nie indukowały produkcji cytokin w obrębie szlaku syntezy PGE₂. W badaniach na izolatach klinicznych wykazano, że są one słabymi agonistami TLR2 i posiadają ekspresję głównie FimA typu II. Do wzmocnienia sygnalizacji TLR2 preferowana jest natomiast akcesorowa podjednostka fimbrialna FimA typu I, występująca w szczepie ATCC 33277. Oznacza to, że zarówno PPAD, jak i fimbrie są niezbędne dla aktywacji TLR2 w trakcie zakażenia *P. gingivalis*.

W drugiej pracy rozszerzono badania i wykazano, że akcesorowe podjednostki fimbrialne są modyfikowane przez PPAD i stymulują odpowiedź na zakażenie *P. gingivalis* w sposób zależny od TLR2. W zakażonych pierwotnych ludzkich fibroblastach dziąseł (PHGF) szczepy *P. gingivalis* z niedoborem PPAD i fimbrii nie aktywowały TLR2 na takim poziomie jak szczep ATCC 33277 typu dzikiego. Dodatkowo, okazało się, że mutanty *P. gingivalis* produkujące FimA, niezależnie od mutacji mają podobny potencjał do aktywowania TLR2 co szczep dziki. Oznacza to, że ligandami TLR2 są inne akcesorowe podjednostki fimbrialne (FimC, FimD i FimE) po zmodyfikowaniu przez PPAD. Doktorantka potwierdziła w badaniach, że prozapalna aktywacja fibroblastów dziąsłowych zależy od PPAD i akcesorowych podjednostek fimbrialnych a nie FimA.

W trzeciej publikacji zweryfikowano, czy odpowiedź makrofagów na zakażenie *P. gingivalis* jest zależna od cytrulinacji. Stwierdzono, że cytrulinacja fimbrii aktywuje proces prozapalny poprzez zwiększenie ekspresji genów syntezy PGE₂ i cytokin. Jednocześnie, istotna jest tu obecność akcesorowych podjednostek fimbrialnych, gdyż fimbrie pozbawione tych podjednostek aktywowały makrofagi bardzo słabo. Cytrulinacja i obecność akcesorowych podjednostek fimbrialnych wpływa także na zahamowanie aktywacji Akt i produkcji reaktywnych form tlenu. Ostatecznie, prowadzi to do zwiększenia przeżywalności *P. gingivalis* w makrofagach.

Biorąc pod uwagę powyższe trzy publikacje, należy podkreślić duże znaczenie badań prowadzonych przez Doktorantkę. Opis stosowanych metod badawczych jest wyczerpujący i

szczegółowy. Przedstawione wyniki przedstawiają nowe dane niezwykle ważne dla poznania patogenności *Porphyrromonas gingivalis*.

Prace w rozprawie doktorskiej są opracowaniami zbiorowymi i we wszystkich Pani mgr Aleksandra Wielento jest pierwszym autorem. Z załączonych oświadczeń współautorów wynika, że Doktorantka odegrała wiodącą rolę w zaplanowaniu badań, ich wykonaniu, opracowaniu i analizie wyników oraz przygotowaniu manuskryptów do publikacji. Cykl publikacji wchodzący w skład rozprawy doktorskiej stanowi spójny tematycznie, wartościowy dorobek naukowy. Ze względu na wysoki poziom ocenianej rozprawy, nie wnoszę uwag krytycznych.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-4 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668, z późn. zm.). Wobec tego wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Wielento do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Jednocześnie, zgłaszam wniosek o wyróżnienie pracy ze względu na niezwykle ważną tematykę przeprowadzonych badań, szeroki i zaawansowany warsztat badawczy, uzyskanie wyników istotnych dla nauk medycznych i biologicznych, a także wysoką sumaryczną wartość IF dwóch publikacji wchodzących w skład rozprawy.

Z wyrazami szacunku,

Kierownik
Katedry i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej

Dr hab. n. med. Tomasz M. Karpiński, Prof. UM



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

Kierownik: dr hab. n. med. Tomasz M. Karpiński, prof. UM

ul. Rokietnicka 10
60-806 Poznań

tel.: 61 641-85-55
e-mail: tkarpin@ump.edu.pl

Poznań, 14.08.2023.

Review

of the doctoral dissertation of Aleksandra Wielento, MA

„A novel mechanism of manipulation of the host immune response by *Porphyromonas gingivalis*: The role of PPAD and fimbriae in TLR2-dependent signaling”

prepared under your guidance of Prof. dr hab. Jan Potempa
and Dr Aleksander Grabiec

at the Department of Microbiology of the Faculty of Biochemistry, Biophysics
and Biotechnology of the Jagiellonian University in Krakow

The doctoral dissertation of Ms. Aleksandra Wielento presented for review is a thematically coherent series of three publications. Two papers have been published in journals with a total IF = 11. The third paper is awaiting publication. The topic of the doctoral thesis is extremely important because it presents the effect of the citrulline of the periopathogen *Porphyromonas gingivalis* on host cells. *P. gingivalis* is a common anaerobe of the oral cavity, implicated in the development of periodontal diseases, arthritis, atherosclerosis and gastrointestinal cancers. A new mechanism related to protein citrullination described in the doctoral thesis indicates that *P. gingivalis* can manipulate the host's immune response. This discovery may be important in the development of new methods of treatment and prevention of diseases caused by *P. gingivalis*.

The doctoral dissertation includes an abstract in English and Polish, an introduction, research objectives, results and discussion. In addition, copies of publications and statements of co-authors are attached.

At the outset, I would like to emphasize the advantages of the doctoral dissertation, including the ability of the PhD student to use many research methods, including cell cultures, preparation of mutants, fimbriae isolation, RNA isolation, quantitative PCR, reporter studies, Western blotting, ELISA and sequencing. In addition, the results were properly described and very well illustrated, and the discussion conducted by the author indicates her excellent knowledge of the researched issue. I believe that this contributed to obtaining results of global importance.

The doctoral dissertation includes the following articles:

1. Wielento A, Bereta GP, Łagosz-Ćwik KB, Eick S, Lamont RJ, Grabiec AM, Potempa J. TLR2 activation by *Porphyromonas gingivalis* requires both PPAD activity and fimbriae. *Front Immunol.* 2022;13:823685. doi: 10.3389/fimmu.2022.823685.
2. Wielento A, Bereta GP, Szczęśniak K, Jacuła A, Terekhova M, Artyomov MN, Hasegawa Y, Grabiec AM, Potempa J. Accessory fimbrial subunits and PPAD are necessary for TLR2 activation by *Porphyromonas gingivalis*. *Mol Oral Microbiol.* 2023;38(4):334-346. doi: 10.1111/omi.12427.
3. Wielento A, Drapała D, Jacuła A, Hasegawa Y, Bagaitkar J, Grabiec A, Potempa J. Citrullinated *P. gingivalis* accessory fimbriae subunits are novel TLR2 agonists essential for proinflammatory activation and inhibition of bactericidal activity of phagocytes. – unpublished.

In the first publication, the author examined the effect of *P. gingivalis* peptidylarginine deiminase (PPAD) on the activation of the Toll-like receptor-2 (TLR2), fimbriae and outer membrane vesicles (OMV) of *P. gingivalis*. One of the virulence factors of *P. gingivalis* is the unique PPAD enzyme, which converts C-terminal Arg residues in bacterial and host proteins and peptides into citrulline. PPAD stimulates the pro-inflammatory response in gingival fibroblasts by activating prostaglandin E2 (PGE2) synthesis. In the human body, *P. gingivalis* is mainly recognized by the TLR2 receptor. Using reporter cell lines, the PhD student showed that PPAD activity is required for TLR2 activation by *P. gingivalis* cells and OMVs. She also found that fimbriae from the wild-type strain (ATCC 33277) stimulated a pro-inflammatory

response in human gingival fibroblasts, while fimbriae from PPAD-deficient strains did not induce cytokine production within the PGE2 synthesis pathway. In studies, clinical isolates have been shown to be weak TLR2 agonists and express mainly type II FimA. In contrast, the type I FimA fimbrial accessory subunit found in strain ATCC 33277 is preferred to enhance TLR2 signaling. This means that both PPAD and fimbriae are required for TLR2 activation during *P. gingivalis* infection.

In the second paper, the study was extended and it was shown that accessory fimbrial subunits are modified by PPAD and stimulate the response to *P. gingivalis* infection in a TLR2-dependent manner. In infected primary human gingival fibroblasts (PHGF), the PPAD- and fimbriae-deficient *P. gingivalis* strains did not activate TLR2 at the same level as the ATCC 33277 wild-type strain. In addition, it turned out that mutants of *P. gingivalis* producing FimA, regardless of the mutation, have a similar potential to activate TLR2 as the wild-type strain. That is, the TLR2 ligands are other accessory fimbrial subunits (FimC, FimD and FimE) after being modified by PPAD. The PhD student confirmed in her research that the pro-inflammatory activation of gingival fibroblasts depends on PPAD and accessory fimbrial subunits, but not FimA.

In the third publication, it was verified whether the macrophage response to *P. gingivalis* infection is dependent on citrullination. Fimbrial citrullination has been found to activate the pro-inflammatory process by increasing the expression of PGE2 and cytokine synthesis genes. At the same time, the presence of accessory fimbrial subunits is important here, because fimbriae lacking these subunits activated macrophages very weakly. Citrullination and the presence of accessory fimbrial subunits also inhibit the activation of Akt and the production of reactive oxygen species. Ultimately, this leads to increased survival of *P. gingivalis* in macrophages.

Considering the above three publications, the importance of research conducted by the PhD student should be emphasized. The description of the used research methods is exhaustive and detailed. The presented results present new data that are extremely important for understanding the pathogenicity of *Porphyromonas gingivalis*.


The works in the doctoral dissertation are collective studies and in all of them Ms. Aleksandra Wielento is the first author. The attached statements of the co-authors show that the PhD student played a leading role in planning the research, conducting it, compiling and analyzing the results, and preparing the manuscripts for publication. The series of publications included in the doctoral dissertation is a thematically coherent, valuable scientific output. Due to the high level of the assessed dissertation, I do not make any critical remarks.

The doctoral dissertation submitted for evaluation meets the conditions set out in Art. 187 sec. 1-4 of the Act of 20 July 2018 Law on Higher Education and Science (Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, Dz. U. z 2018 r. item 1668, as amended). Therefore, I am applying to the Biological Sciences Discipline Council of the Jagiellonian University to admit Aleksandra Wielento, MSc, to the further stages of the procedure for conferring a doctoral degree

At the same time, I submit an application for honoring the work due to the extremely important subject of the research, the broad and advanced research workshop, obtaining results relevant to medical and biological sciences, as well as the high total IF value of two publications included in the dissertation.

Yours faithfully,

Kierownik
Katedry i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej


Dr hab. n. med. Tomasz M. Karpiński, Prof. UM