

Autoreferat

dr Aleksander M. Grabiec

Epigenetyczne mechanizmy regulacyjne w przewlekłym zapaleniu przyzębia: charakterystyka roli acetylacji histonów i metylacji DNA w fibroblastach dziąsła w kontekście homeostazy tkanek przyzębia

Zakład Mikrobiologii
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński



1. Imię i nazwisko: Aleksander M. Grabiec

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe:

a) stopień naukowy doktora

Instytucja przyznająca: Akademickie Centrum Medyczne Uniwersytetu Amsterdamskiego, Amsterdam, Królestwo Niderlandów.

Data nadania stopnia: 6.07.2012 r.

Dyscyplina: nauki biomedyczne

Tytuł: Regulation of inflammation by histone deacetylases in rheumatoid arthritis – beyond epigenetics.

Promotor: prof. Paul-Peter Tak

Promotor pomocniczy: dr Kris A. Reedquist

b) tytuł zawodowy magistra

Instytucja przyznająca: Uniwersytet Jagielloński w Krakowie, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii

Data nadania tytułu: 21.06.2007 r.

Kierunek studiów: Biotechnologia, specjalizacja: biochemia, 5-letnie studia magisterskie

Tytuł: Protein acetylation in rheumatoid arthritis. Influence of protein deacetylase inhibitors on the survival of monocytic cell line THP-1 and human primary macrophages.

Promotor: prof. dr hab. Joanna Bereta

Recenzent: prof. dr hab. Andrzej Klein

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

1.10.2018 – obecnie:

Adiunkt badawczy, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński. Zatrudnienie w wymiarze pełnego etatu jako kierownik projektów FNP FIRST TEAM V (2018-2021) oraz NCN OPUS 18 (2021-obecnie).

1.10.2016 – 30.09.2018:

Marie Skłodowska-Curie Fellow, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński. Zatrudnienie w wymiarze pełnego etatu jako kierownik projektu NCN POLONEZ 1.

1.08.2013 – 30.09.2016:

Staż podoktorski, Manchester Collaborative Centre for Inflammation Research, Uniwersytet w Manchesterze, Manchester, Wielka Brytania.

1.08.2012 – 31.07.2013:

Staż podoktorski – Zakład Immunologii Klinicznej i Reumatologii, Akademickie Centrum Medyczne Uniwersytetu Amsterdamskiego, Amsterdam, Królestwo Niderlandów.

1.10.2007 – 30.06.2012:

Doktorant – Zakład Immunologii Klinicznej i Reumatologii, Akademickie Centrum Medyczne Uniwersytetu Amsterdamskiego, Amsterdam, Królestwo Niderlandów.

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.):

Prezentowane osiągnięcie naukowe opiera się na serii powiązanych tematycznie artykułów naukowych (publikacje 1-4), opisujących wyniki badań przeprowadzonych w ramach realizacji dwóch projektów badawczych: *“Epigenetics of periodontitis: alterations in the host protein acetylation system as a potentially fundamental mechanism for disease development”* (Narodowe Centrum Nauki, POLONEZ 2016-2018; 2015/19/P/NZ7/03659) oraz *“Epigenetics of periodontitis: DNA methylation in disease development and as a potential therapeutic target”* (Fundacja na rzecz Nauki Polskiej, FIRST TEAM 2018-2022; POIR.04.04.00-00-5EDE/18-00). Jestem autorem obu projektów badawczych i pełniłem w nich rolę kierownika projektu. Wymienionym oryginalnym publikacjom towarzyszą dwa artykuły przeglądowe (publikacje 5-6), które stanowią kompleksowe i krytyczne podsumowanie tych dziedzin badań.

We wszystkich publikacjach eksperymentalnych byłem autorem hipotez badawczych, pozyskałem finansowanie na badania, stworzyłem koncepcję i zaprojektowałem metodologię badań, nadzorowałem prace eksperymentalne, przeprowadziłem końcową analizę i interpretację wyników, przygotowałem ryciny i napisałem wstępne wersje artykułów. Wykonałem również część eksperymentów (publikacje 3 i 4). W obu artykułach przeglądowych zaprojektowałem koncepcję i zakres pracy, przeprowadziłem przegląd literatury i napisałem większość tekstu publikacji. Jestem autorem korespondującym (publikacje 1, 2, 5 i 6) lub współautorem korespondującym (publikacje 2 i 4) wszystkich publikacji wymienionych poniżej.

1. Lagosz-Cwik KB, Melnykova M, Nieboga E, Schuster A, Bysiek A, Dudek S, Lipska W, Kantorowicz M, Tyrakowski M, Darczuk D, Kaczmarzyk T, Gilijamse M, de Vries TJ, Potempa J and **Grabiec AM**. Mapping of DNA methylation-sensitive cellular processes in gingival and periodontal ligament fibroblasts in the context of periodontal tissue homeostasis. *Front. Immunol.* 2023;14:1078031.
IF 2021: 8,787; punkty MEN: 140; liczba cytowań: 0.
2. Lagosz-Cwik KB, Wielento A, Lipska W, Kantorowicz M, Darczuk D, Kaczmarzyk T, Gibbs S, Potempa J, **Grabiec AM**. hTERT-immortalized gingival fibroblasts respond to cytokines but fail to mimic primary cell responses to *Porphyromonas gingivalis*. *Sci Rep.* 2021;11(1):10770.
IF 2021: 4,997; punkty MEN: 140; liczba cytowań: 8.
3. Lagosz KB, Bysiek A, Macina JM, Bereta GP, Kantorowicz M, Lipska W, Sochalska M, Gawron K, Kaczmarzyk T, Chomyszyn-Gajewska M, Fossati G, Potempa J, **Grabiec AM**. HDAC3 Regulates Gingival Fibroblast Inflammatory Responses in Periodontitis. *J Dent Res.* 2020;99(1):98-106.
IF 2020: 6,116; punkty MEN: 140; liczba cytowań: 14.

4. Maksylewicz A, Bysiek A, Lagosz KB, Macina JM, Kantorowicz M, Bereta G, Sochalska M, Gawron K, Chomyszyn-Gajewska M, Potempa J, **Grabiec AM**. BET Bromodomain Inhibitors Suppress Inflammatory Activation of Gingival Fibroblasts and Epithelial Cells From Periodontitis Patients. *Front Immunol*. 2019;10:933.
IF 2019: 5,085; punkty MEN: 140; liczba cytowań: 21.
5. Jurdziński KT, Potempa J, **Grabiec AM**. Epigenetic regulation of inflammation in periodontitis: cellular mechanisms and therapeutic potential. *Clin Epigenetics*. 2020;12(1):186.
IF 2020: 6,551; punkty MEN: 140; liczba cytowań: 32.
6. **Grabiec AM**, Potempa J: Epigenetic regulation in bacterial infections: targeting histone deacetylases. *Crit Rev Microbiol*. 2018;44(3):336-350.
IF 2018: 5,697; punkty MEN: 100; liczba cytowań: 60.

(Liczba cytowań pochodzi z bazy danych Scopus wg stanu na 19.04.2023, współczynniki oddziaływania czasopism IF na podstawie *Clarivate Journal Citation Reports* z roku, w którym ukazała się dana publikacja)

Wprowadzenie

Przewlekłe zapalenie przyzębia (PZP), zwane potocznie paradontozą, jest chorobą związaną z chronicznym stanem zapalnym spowodowaną zaburzeniem równowagi mikrobiologicznej (dysbiozą) w bakteryjnym biofilmie (płytkce nazębnej) na powierzchni zębów (1). PZP dotyka około 30% światowej populacji, z czego u 10% rozwija się ciężka postać choroby, która prowadzi do nieuchronnej utraty zębów. Nielezione PZP wiąże się ze zwiększonym ryzykiem rozwoju wielu chorób ogólnoustrojowych, w tym reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS), miażdżycy tętnic i nowotworów (2). Szacuje się, że PZP i choroby z nim związane spowodowały w Europie straty na poziomie ponad 150 miliardów EUR w 2018 roku (3). Istnieje zatem pilna potrzeba opracowania nowych terapii, które mogłyby wspierać obecnie stosowane metody leczenia skupiające się na zmniejszeniu ilości bakterii w tkance przyzębia (tzw. skaling i oczyszczanie powierzchni korzenia). Testowane obecnie nowe strategie terapeutyczne w PZP bazują między innymi na koncepcji „terapii modulującej odpowiedź gospodarza” (ang. *host modulation therapy*). Koncepcja ta opiera się na założeniu, że konwencjonalne leczenie periodontologiczne będzie wspomagane środkami terapeutycznymi łagodzącymi destrukcyjne skutki niekontrolowanej aktywacji układu odpornościowego gospodarza (4). Niezbędnym etapem w procesie identyfikacji nowych kierunków terapeutycznych jest dokładniejsze scharakteryzowanie mechanizmów molekularnych leżących u podstaw przewlekłego stanu zapalnego u pacjentów z PZP. Wśród procesów komórkowych odgrywających kluczową rolę w regulacji przewlekłego stanu zapalnego i mogących stanowić przyszłe cele interwencji terapeutycznej, rola epigenetycznej regulacji ekspresji genów pozostawała dotychczas niedostatecznie zbadana.

Wiele aspektów odpowiedzi immunologicznej jest kontrolowanych przez epigenetyczne mechanizmy regulacyjne. Najczęściej definiuje się je jako stabilne zmiany w profilu ekspresji genów lub fenotypie komórkowym, które są spowodowane modyfikacjami chromosomów bez zmian w sekwencji DNA (5). Mechanizmy komórkowe odpowiedzialne za

regulację epigenetyczną obejmującą metylację chromosomalnego DNA i potranslacyjne modyfikacje białek histonowych, wśród których acetylacja jest procesem podlegającym najbardziej dynamicznej regulacji w odpowiedzi na bodźce środowiskowe, takie jak infekcja. Acetylotransferazy histonowe (ang. *histone acetyltransferases*, HAT) katalizują reakcje acetylacji N-końcowych reszt lizyny białek histonowych. Proces ten prowadzi do otwarcia struktury chromatyny i rekrutacji regulatorów transkrypcji rozpoznających acetylowane reszty lizyny, takich jak białka BET zawierające bromodomeny. Zazwyczaj zwiększony poziom acetylacji histonów jest związany z aktywacją transkrypcji. Deacetylazy histonowe (ang. *histone deacetylases*, HDAC) usuwają grupy acetylowe z histonów, co prowadzi do kondensacji chromatyny i zakończenia transkrypcji (6). Metylacja DNA jest katalizowana przez metylotransferazy DNA (ang. *DNA methyltransferases*, DNMT), zazwyczaj zachodzi w dinukleotydach CpG i powoduje represję transkrypcji poprzez rekrutację białek pełniących rolę korepresorów lub zaburzenie wiązania czynników transkrypcyjnych z DNA (7).

W ciągu ostatnich dwóch dekad badań zaobserwowano istotną rolę zaburzeń mechanizmów epigenetycznych w wielu chorobach przewlekłych. Obserwacje te pozwoliły zidentyfikować enzymy modyfikujące histony (ang. *histone-modifying enzymes*, HMEs) jako potencjalne cele nowoczesnych terapii (8). Dotychczas najbardziej wszechstronna analiza nieprawidłowej regulacji konkretnego HME, której towarzyszyła przedkliniczna i kliniczna ocena terapeutycznego potencjału blokowania jego aktywności, została przedstawiona w przypadku HDAC w RZS (9). **Moje badania prowadzone podczas studiów doktoranckich w Akademickim Centrum Medycznym Uniwersytetu Amsterdamskiego umożliwiły scharakteryzowanie przeciwwzapalnego działania drobnocząsteczkowych inhibitorów HDAC (HDACi) w wycinkach błony maziowej, makrofagach i fibroblastach błony maziowej pochodzących od pacjentów z RZS oraz zidentyfikowanie mechanizmów molekularnych leżących u jego podstaw (10–14).** Zgodnie z tymi obserwacjami, badania kliniczne HDACi wykazały, że givinostat (ITF2357) hamuje uwalnianie cytokin prozapalnych w badaniu fazy I u zdrowych uczestników (15) i wykazuje skuteczność kliniczną w badaniu fazy II u pacjentów z młodzieńczym idiopatycznym zapaleniem stawów (16). W tym miejscu warto podkreślić, że HDACi oraz inhibitory DNMT są lekami zatwierdzonymi do leczenia niektórych typów nowotworów, w tym ostrej białaczki szpikowej, zespołu mielodysplastycznego i skórniego chłoniaka T-komórkowego (17).

Przewlekły stan zapalny w PZP jest wynikiem nadmiernej aktywności układu odpornościowego gospodarza, której celem jest wyeliminowanie bakterii chorobotwórczych występujących w płytce nazębnej, takich jak *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* i *Filifactor alocis* (1). Te beztlenowe patogeny dysponują wyrafinowanymi mechanizmami unikania antybakteryjnego działania komórek układu odpornościowego gospodarza, w tym bakteriobójczych aspektów odpowiedzi immunologicznej, przy jednoczesnym podtrzymaniu degradacji tkanki dotkniętej stanem zapalnym, stanowiącej dla bakterii źródło składników odżywczych (18). Fibroblasty dziąsła (ang. *gingival fibroblasts*, GF) stanowią niezbędny element strukturalny przyzębia odpowiadający za utrzymanie integralności tkanek. Jednakże fizjologiczna rola GF nie ogranicza się do produkcji i przebudowy macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *extracellular matrix*, ECM). Komórki te również silnie reagują na bodźce zapalne i działają jako „komórki wartownicze”, które modulują odpowiedź immunologiczną na patogeny jamy ustnej atakujące tkankę

przyzębia (19). Opracowany niedawno za pomocą sekwencjonowania RNA w pojedynczych komórkach atlas komórkowy błony śluzowej jamy ustnej nie tylko ujawnił wcześniej niedocenianą heterogeniczność populacji GF, ale także potwierdził zdolność tych komórek do kierowania procesami zapalnymi w PZP poprzez specyficzną stymulację napływu neutrofilii (20). GF reagują na bakterie i sygnały związane z uszkodzeniem tkanki wytwarzając cytokiny, chemokiny i inne mediatory zapalne. Stanowią zatem ważny element wrodzonego układu odpornościowego. Chociaż aktywacja zapalna GF ma na celu ułatwienie eliminacji patogennych bakterii a następnie wyciszenie stanu zapalnego, niekontrolowana lub nadmierna stymulacja tych komórek może sprzyjać rozwojowi przewlekłego stanu zapalnego i degradacji kości wyrostka zębodołowego (21). Dzieje się tak w PZP, w którym GF mogą wykazywać trwały fenotyp prozapalny, ułatwiający wzrost patogenów, stymulujący osteoklastogenezę i utrwalający przewlekły stan zapalny (22).

Obserwacje pochodzące z badań fibroblastów w innych tkankach wskazują, że ich różnorodność anatomiczna, potencjał immunologiczny i pamięć wcześniejszych zdarzeń związanych ze stanem zapalnym lub infekcją mogą być konsekwencją mechanizmów epigenetycznych (23). W tym kontekście niewiele uwagi poświęcono epigenetycznym mechanizmom regulacyjnym w GF. **Opisane w tym autoreferacie osiągnięcie naukowe przedstawia kompleksową analizę roli procesów epigenetycznych w regulacji kluczowych funkcji biologicznych GF, ze szczególnym uwzględnieniem komórkowej aktywacji zapalnej komórek w odpowiedzi na patogeny jamy ustnej i środowisko zapalne tkanki.** Moje badania koncentrowały się na dwóch rodzinach białek biorących udział w regulacji acetylacji histonów, białkach BET i HDAC, oraz na konsekwencjach rozregulowanych procesów odpowiedzialnych za metylację DNA w GF. Wyniki przedstawionych badań nie tylko poszerzają wiedzę na temat roli mechanizmów epigenetycznych w interakcjach patogen-gospodarz w PZP, ale także mogą stanowić podstawę przyszłych analiz mających na celu kliniczną ocenę potencjału terapeutycznego inhibitorów tych mechanizmów epigenetycznych.

Część 1:

Identyfikacja białek bromodomenowych BET jako potencjalnych celów przeciwzapalnej terapii modulującej odpowiedź gospodarza w PZP.

Maksylewicz A, Bysiek A, ... **Grabiec AM**. BET Bromodomain Inhibitors Suppress Inflammatory Activation of Gingival Fibroblasts and Epithelial Cells From Periodontitis Patients. *Front Immunol.* 2019;10:933.

Wstęp

Białka bromodomenowe zawierają domeny wiążące acetylowane reszty ε-N-lizyny na ogonach białek histonowych i regulują tworzenie zależnych od acetylacji kompleksów chromatyny, które są niezbędne w procesie transkrypcji (24). Z tego powodu białka bromodomenowe odgrywają kluczową rolę w reorganizacji struktury chromatyny i aktywacji transkrypcji, działając jako „białka odczytujące” acetylację histonów (ang. *reader proteins*). Wśród 46 białek zawierających bromodomeny zidentyfikowanych w ludzkich komórkach,

rodzina białek BET (ang. *bromodomain and extraterminal domain*), do której należą białka BRD2, BRD3 i BRD4, jest niezbędnym łącznikiem pomiędzy acetylacją histonów i transkrypcją genów (25).

Rodzina białek BET odgrywa ważną rolę w transkrypcyjnej aktywacji genów związanych ze stanem zapalnym. Niedawno odkryte inhibitory blokujące bromodomeny białek BET, takie jak I-BET151 i JQ1, obniżają ekspresję cytokin i chemokin prozapalnych w makrofagach stymulowanych lipopolisacharydem (LPS) *in vitro* i hamują rozwój wstrząsu septycznego w modelach zwierzęcych (26,27). **Badania, w których brałem udział podczas stażu podoktorskiego w Akademickim Centrum Medycznym Uniwersytetu Amsterdamskiego wykazały, że I-BET151 obniża proliferację oraz produkcję cytokin, chemokin i mediatorów degradujących ECM w fibroblastach błony maziowej pochodzących od pacjentów z RZS (28).** Wykazano również, że związki te łagodzą objawy choroby w zwierzęcych modelach schorzeń związanych z przewlekłym stanem zapalnym, takich jak eksperymentalne autoimmunologiczne zapalenie mózgu, choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi i zapalenie stawów. Wyniki te sugerują znaczny potencjał terapeutyczny inhibitorów białek BET związany z ich działaniem immunomodulacyjnym (29,30).

Pomimo intensywnych badań zmierzających do zrozumienia funkcji bromodomen w stanie zapalnym, rola białek BET w patogenezie PZP pozostaje niedostatecznie scharakteryzowana. W momencie zainicjowania przeze mnie opisanych tu badań tylko jedna publikacja opisywała działanie inhibitora białek BET w zwierzęcym modelu PZP. JQ1 łagodził stan zapalny dziąseł i hamował degradację kości wyrostka zębodołowego w zapaleniu przyzębia wywołanym u myszy przez *P. gingivalis*. Efekty te prawdopodobnie były konsekwencją zmniejszonej produkcji cytokin prozapalnych przez makrofagi i zahamowania osteoklastogenezy (31).

Cel badania

Celem badań było scharakteryzowanie roli białek BET w aktywacji zapalnej i odpowiedzi przeciwbakteryjnej GF w kontekście zakażenia głównym patogenem PZP, *P. gingivalis*, oraz stymulacji cytokinami odgrywającymi istotną rolę w patogenezie PZP. W badaniach zastosowano inhibitory białek BET działające jako mimetyki acetylowanych histonów, I-BET151 i JQ1. Aby uzyskać pełniejszy obraz potencjalnych konsekwencji blokowania funkcji białek BET w tkance dziąsła, porównano wpływ tych związków na GF i komórki nabłonkowe dziąsła (ang. *gingival epithelial cells*, GEC).

Wyniki

W niniejszym badaniu kompleksowo przeanalizowano wpływ inhibitorów białek BET na funkcje biologiczne GF. Pierwotne linie GF pochodzące od zdrowych dawców traktowano I-BET151 lub JQ1 przed stymulacją czynnikiem martwicy nowotworu (ang. *tumor necrosis factor*, TNF) lub interleukiną-1 β (IL-1 β). W komórkach traktowanych I-BET151 zaobserwowano znaczące obniżenie ekspresji wielu mediatorów stanu zapalnego. Wśród genów, których ekspresja była zależna od aktywności białek BET znalazły się cytokiny (*IL6*, *IL1B*), chemokiny (*IL8*, *CCL2*, *CCL5*), metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (*MMP3*) i komponenty szlaku syntezy prostaglandyny E2 (*COX2*). Oba badane inhibitory

białek BET w sposób zależny od dawki zmniejszały produkcję IL-8 i CCL2. Co istotne, efekty te nie były związane z jakimkolwiek zmniejszeniem żywotności komórek.

Następnie zbadano efekty zablokowania aktywności białek BET w GF poddanych zakażeniu *P. gingivalis*. Oba badane inhibitory znacząco hamowały indukcję szerokiego zakresu mediatorów stanu zapalnego, w tym *IL8*, *IL1B*, *CCL2*, *CCL5*, *MMP3*, *COX2* oraz, w mniejszym stopniu, *IL6*. Podobnie jak w przypadku ekspresji mRNA, I-BET151 i JQ1 znacznie zmniejszały indukowane przez *P. gingivalis* wydzielanie IL-8 i CCL2 przez GF, podczas gdy ich wpływ na produkcję IL-6 był mniej wyraźny. Co ciekawe, JQ1 wywierał silniejszy wpływ na ekspresję i produkcję mediatorów stanu zapalnego w porównaniu z I-BET151. Należy zauważyć, że linie GF izolowane od pacjentów z PZP wykazywały podobną wrażliwość na działanie przeciwzapalne inhibitorów BET, jak komórki pochodzące od osób zdrowych. Natomiast badane inhibitory nie miały wpływu na internalizację i przeżycie wewnątrzkomórkowe *P. gingivalis* w GF, co sugeruje, że białka BET są selektywnie zaangażowane w regulację transkrypcji genów związanych ze stanem zapalnym, ale nie uczestniczą w procesach regulujących adhezję, fagocytozę i eliminację bakterii.

Obserwowana aktywność przeciwzapalna inhibitorów białek BET prawdopodobnie jest wynikiem zaburzenia epigenetycznych procesów regulacyjnych na promotorach poszczególnych genów (tj. blokadą rozpoznawania acetylowanych histonów przez bromodomeny białek BET i późniejszej rekrutacji koaktywatorów transkrypcji). Chociaż nie wykazano tego bezpośrednio na poziomie chromatyny, wykluczono alternatywne mechanizmy działania inhibitorów BET. I-BET151 nie miał wpływu na aktywację szlaków kinazy białkowej aktywowanej mitogenem (ang. *mitogen-activated protein*, MAP) i czynnika jądrowego κ B (ang. nuclear factor κ B, NF- κ B), o których wiadomo, że są regulowane przez odwracalną acetylację i oddziałują z białkami BET. I-BET151 nie wpływał również na poziom acetylacji histonów. Ta obserwacja wyklucza możliwość, że hamowanie białek BET może pośrednio wpływać na aktywność HAT lub HDAC. Ponadto synteza białek *de novo* nie była niezbędna do działania przeciwzapalnego I-BET151, co wskazuje, że obserwowane efekty nie były wtórną konsekwencją indukcji korepresorów transkrypcyjnych.

Na koniec porównano wpływ inhibitorów BET na aktywację GF z odpowiedzią GEC na te inhibitory. W obu przypadkach I-BET151 i JQ1 znacząco zmniejszały ekspresję i/lub sekrecję indukowanych przez cytokiny i *P. gingivalis* mediatorów stanu zapalnego i resorpcji kości zarówno w unieśmiertelnionej linii GEC, TIGK (ang. *telomerase-immortalized gingival keratinocytes*), (*IL6*, *IL8*, *IL1B*, *CXCL10*, *MMP9*), jak i w pierwotnych GEC (*IL6*, *IL1B*, *CCL2*, *COX2*). Podobnie jak w przypadku GF, inhibitory BET nie miały wpływu na żywotność GEC, jak również na adhezję i przeżywalność bakterii w tych komórkach. Podsumowując, eksperymenty te pozwoliły na zidentyfikowanie szerokiego spektrum działania przeciwzapalnego inhibitorów BET, które mogą wpływać na wiele typów komórek znajdujących się w tkance dziąsła. Efektem tego działania jest podtrzymywanie przewlekłego stanu zapalnego w PZP poprzez wytwarzanie nadmiernych ilości mediatorów zapalnych.

Główne wnioski:

- **Białka BET są kluczowymi regulatorami odpowiedzi zapalnej GF, a ich aktywność jest wymagana do indukcji transkrypcji cytokin, chemokin i innych mediatorów stanu zapalnego grywających kluczową rolę w patogenezie PZP.**

- Inhibitory BET wykazują silne właściwości przeciwzapalne bez wpływu na żywotność GF i ich podatność na inwazję bakteryjną.
- Białka BET mogą stanowić potencjalne cele terapii modulującej odpowiedź gospodarza w PZP ze względu na ich zdolność do tłumienia wielu aspektów przewlekłego stanu zapalnego wywołanego przez patogeny jamy ustnej.
- To badanie jest pierwszą i jak dotąd jedyną analizą funkcji białek BET w pierwotnych ludzkich GF pochodzących od zdrowych dawców i pacjentów z PZP.

Część 2:

Identyfikacja kluczowej roli deacetylazy histonowej 3 (HDAC3) w aktywacji zapalnej GF.

Lagosz KB, Bysiek A, ... **Grabiec AM**. HDAC3 Regulates Gingival Fibroblast Inflammatory Responses in Periodontitis. *J Dent Res*. 2020;99(1):98-106.

Grabiec AM, Potempa J: Epigenetic regulation in bacterial infections: targeting histone deacetylases. *Crit Rev Microbiol*. 2018;44(3):336-350.

Wstęp

Odpowiedź immunologiczna podlega precyzyjnej regulacji przez mechanizmy epigenetyczne, wśród których znaczącą rolę odgrywa odwracalna acetylacja białek histonowych. Acetylacja histonów zachodzi na N-końcowych resztach lizyny i jest zależna od równowagi między aktywnością enzymatyczną białek HAT i HDAC (32). W komórkach ssaków rodzina HDAC składa się z 18 białek podzielonych na cztery klasy: HDAC klasy I (HDAC 1–3 i 8), HDAC klasy II (HDAC 4–7, 9, 10), HDAC klasy III zwane sirtuinami (Sirt1–7) oraz HDAC klasy IV, do której należy jedynie HDAC11. Poszczególne białka należące do rodziny HDAC różnią się lokalizacją wewnątrzkomórkową i profilem aktywności enzymatycznej oraz wykazują specyficzne dla różnych tkanek wzorce ekspresji (33). Zaburzenia ekspresji i aktywności HDAC zaobserwowano w licznych chorobach związanych z przewlekłym stanem zapalnym, takich jak astma, przewlekła obturacyjna choroba płuc, choroba Crohna, toczeń rumieniowaty układowy i RZS (34).

Zidentyfikowanie kluczowej roli HDAC w inicjowaniu i podtrzymywaniu stanu zapalnego zainspirowało szeroko zakrojone analizy potencjału terapeutycznego drobnocząsteczkowych HDACi. Istnieje szereg badań pokazujących, że związki te wykazują silne właściwości przeciwzapalne w wielu typach komórek, w tym komórkach immunologicznych i strukturalnych, oraz w zwierzęcych modelach schorzeń związanych ze stanem zapalnym (8,35). Obserwacje te wskazują, że blokowanie aktywności HDAC może stanowić nową strategię terapeutyczną w chorobach o charakterze przewlekłego stanu zapalnego.

Niedawne badania pokazujące, że wiele patogennych gatunków bakterii ma zdolność unikania odpowiedzi immunologicznej gospodarza poprzez rozregulowanie procesów transkrypcyjnych zależnych od aktywności HDAC dostarczyły dodatkowych dowodów potwierdzających centralną rolę tych enzymów w odpowiedzi immunologicznej. **W artykule przeglądowym, który szczegółowo przedstawia tło prac eksperymentalnych opisanych w**

tej części autoreferatu, obszernie omówiłem te nowo odkryte mechanizmy unikania aktywności układu odpornościowego przez bakterie i podsumowałem obecny stan wiedzy w zakresie możliwości odwracania tych patofizjologicznych procesów za pomocą HDACi (36). Wiele bakterii chorobotwórczych wykształciło wyrafinowane strategie unikania aktywności komórek układu immunologicznego. Mechanizmy te obejmują produkcję czynników wirulencji lub metabolitów zaburzających działania HDAC i procesów transkrypcyjnych zależnych od HDAC. W wielu przypadkach prowadzi to do wyciszenia ekspresji genów związanych z odpowiedzią antybakteryjną i ułatwia przeżycie bakterii w organizmie zakażonego gospodarza. W tym kontekście blokowanie aktywności HDAC za pomocą HDACi może pomóc w reaktywowaniu odpowiedzi immunologicznej przeciwko patogenom. HDACi mogą również wspomagać eliminację bakterii chorobotwórczych poprzez indukcję peptydów antybakteryjnych w komórkach nabłonka. Jednakże szerokie spektrum aktywności przeciwzapalnej HDACi może też upośledzać odpowiedź immunologiczną przeciwko niektórym patogenom, takim jak *Klebsiella pneumoniae* i *Candida albicans* (37). Z tego powodu istnieje delikatna równowaga między potencjalnie korzystnym i szkodliwym wpływem HDACi na odpowiedź antybakteryjną, a konsekwencje blokowania aktywności HDAC w chorobach zakaźnych są charakterystyczne dla danego patogenu (36).

Dotychczasowe badania wykazały, że ekspresja i aktywność HDAC może być zaburzona również w PZP. Podwyższone poziomy mRNA i białka HDAC1 wykryto w tkankach dziąseł pacjentów z PZP w porównaniu do osób zdrowych, a zwiększona ekspresja HDAC1 wykazywała kolokalizację z komórkami produkującymi TNF (38). Ponadto istnieją doniesienia pokazujące, że infekcja patogenami jamy ustnej wywołuje redukcję poziomu ekspresji HDAC1 i HDAC2 w GEC, oraz kilku genów HDAC klasy II w fibroblastach więzadła przyzębia (ang. *periodontal ligament fibroblasts*, PDLF) (39,40). Z kolei zwiększony poziom acetylacji histonu H3 na lizynie 9 (H3K9) wykryto w GEC poddanych stymulacji LPS, jak również w tkance dziąsła w mysim modelu zapalenia przyzębia (41). Z kolei blokowanie deacetylacji za pomocą HDACi wykazało efekt terapeutyczny, ograniczając utratę kości wyrostka zębodołowego w mysim modelu PZP (42). Chociaż te wstępne doniesienia dostarczyły jasnych dowodów na to, że zmiany w aktywności HDAC mogą być powiązane z patogenezą PZP, wcześniej nie przeanalizowano roli HDAC w aktywacji zapalnej GF i nie zidentyfikowano konkretnych członków rodziny białek HDAC, które mogłyby stanowić nowe cele terapeutyczne w leczeniu PZP.

Cel badania

Celem pracy było scharakteryzowanie roli aktywności HDAC w odpowiedzi zapalnej i przeciwbakteryjnej GF w kontekście stymulacji cytokinami i infekcji patogenami jamy ustnej oraz określenie udziału poszczególnych członków rodziny HDAC w tych procesach. Zastosowanie podejście farmakologicznego opartego na panelu globalnych i selektywnych HDACi w połączeniu z badaniami wyciszenia genów pozwoliło na dokładne zbadanie tych procesów w pierwotnych GF pochodzących od zdrowych dawców i pacjentów z PZP.

Wyniki

W opisywanym badaniu wykorzystano zestaw HDACi o różnych profilach selektywności: kwas suberoilolanilidohydroksamowy (SAHA) i ITF2357 (globalne HDACi), MS-275

(selektywny wobec klasy I, ale preferencyjnie blokujący HDAC1), selektywne inhibitory HDAC6 (HDAC6i(a) i HDAC6i(b)) i HDAC8 (HDAC8i) oraz związek, który jest silnym inhibitorem zarówno HDAC3, jak i HDAC6 (HDAC3/6i). Zmiany poziomu acetylacji histonów i tubuliny wywołane przez HDACi potwierdziły ich aktywność i profil selektywności. Badane związki nie miały też wpływu na żywotność GF.

W pierwszej części badań przeanalizowano wpływ globalnych HDACi na aktywację zapalną GF pochodzących od zdrowych dawców i pacjentów z PZP. Globalne hamowanie aktywności HDAC obniżało poziom ekspresji mediatorów stanu zapalnego, w tym *CCL2*, *CCL5*, *CXCL10*, *COX2* i *IL1B* w komórkach stymulowanych TNF lub poddanych infekcji *P. gingivalis* lub *Fusobacterium nucleatum*. Znacząca supresja indukowanej przez TNF produkcji *CCL2*, *CCL5* i *CXCL10* w GF traktowanych globalnymi HDACi została również potwierdzona na poziomie białka. Warto podkreślić, że podobny profil regulacji ekspresji genów zaobserwowano w GF od pacjentów z PZP traktowanych ITF2357 przed infekcją bakteryjną. Uzyskany wynik wskazuje, że komórki pochodzące z tkanki dziąsła objętej przewlekłym stanem zapalnym nie są odporne na przeciwzapalne działanie globalnych HDACi. Badania mechanistyczne wykazały, że translacja białek nie była wymagana do supresji genów przez HDACi, co sugeruje, że indukcja negatywnych regulatorów transkrypcji nie jest odpowiedzialna za działanie przeciwzapalne tych związków. Globalne blokowanie aktywności HDAC również nie miało wpływu na poziom aktywacji kinaz MAP i czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Wynik ten wskazuje, że bezpośredni wpływ HDACi na te zależne od acetylacji szlaki sygnałowe nie odgrywa znaczącej roli w hamowaniu indukcji genów zapalnych w GF. Warto zauważyć, że globalne HDACi nie miały też wpływu na internalizację i eliminację bakterii *P. gingivalis* przez GF. Można zatem stwierdzić, że przeciwzapalne działanie HDACi nie jest związane ze zwiększoną wrażliwością GF na kolonizację przez patogenne bakterie.

W celu uzyskania odpowiedzi na drugie pytanie badawcze zastosowano panel HDACi o różnych profilach selektywności. Spośród badanych związków tylko wpływ HDAC3/6i na aktywację zapalną GF był porównywalny z obserwowanym po traktowaniu komórek globalnymi HDACi. W przeciwieństwie do tego inhibitora, selektywne blokowanie HDAC1, HDAC6 lub HDAC8 miało znikomą wpływ na wytwarzanie mediatorów stanu zapalnego przez GF. Zaobserwowany w tych doświadczeniach brak wpływu związków specyficznych dla HDAC6 na aktywację GF wskazuje, że działanie przeciwzapalne HDAC3/6i najprawdopodobniej można przypisać hamowaniu HDAC3. Rzeczywiście, wyciszenie ekspresji HDAC3 przy użyciu siRNA miało podobny wpływ na ekspresję mediatorów stanu zapalnego jak selektywne hamowanie HDAC3. Wyciszenie HDAC3 znacznie obniżyło indukowaną przez *P. gingivalis* ekspresję *CCL2*, *IL1B* oraz, w mniejszym stopniu, *MMP3* i *COX2*. Z kolei wyciszenie ekspresji HDAC1 nie wpłynęło na aktywację GF, co jest zgodne z zaobserwowanym wcześniej brakiem regulacji transkrypcji genów zapalnych przez MS-275. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń pozwoliły zatem na zidentyfikowanie HDAC3 jako kluczowego regulatora ekspresji ważnej grupy mediatorów stanu zapalnego biorących udział w patogenezie PZP.

Główne wnioski

- HDACi mają silne działanie przeciwzapalne na GF, któremu nie towarzyszą zmiany żywołności komórek lub ich podatności na infekcje patogenami jamy ustnej.
- **Blokowanie aktywności lub ekspresji HDAC3 wywołuje przeciwzapalne efekty zbliżone do globalnych HDACi, potwierdzając, że HDAC3 jest głównym członkiem rodziny białek HDAC zaangażowanym w regulację transkrypcji genów zapalnych w GF.**
- Białka HDAC, w szczególności HDAC3, mogą stanowić potencjalny cel terapeutycznym w terapii modulującej odpowiedź gospodarza w PZP ze względu na ich zdolność do zapobiegania nadmiernej produkcji cytokin, chemokin i enzymów degradujących ECM przez GF.
- Niniejsze badanie stanowi jak dotąd jedyną kompleksową analizę funkcji biologicznych poszczególnych członków rodziny HDAC w pierwotnych komórkach tkanki dziąsła.

Część 3

Inhibitory DNMT mają szkodliwy wpływ na funkcje biologiczne GF, ale dostarczają ważnych informacji o procesach zależnych od metylacji DNA w PZP.

Lagosz-Cwik KB, Melnykova M, ... **Grabiec AM**. Mapping of DNA methylation-sensitive cellular processes in gingival and periodontal ligament fibroblasts in the context of periodontal tissue homeostasis. *Front. Immunol.* 2023;14:1078031.

Jurdziński KT, Potempa J, **Grabiec AM**. Epigenetic regulation of inflammation in periodontitis: cellular mechanisms and therapeutic potential. *Clin Epigenetics.* 2020;12(1):186.

Wstęp

W niedawno opublikowanych doniesieniach innych grup badawczych zaprezentowano wyniki sugerujące, że blokowanie aktywności innej niż HDAC klasy enzymów regulujących mechanizmy epigenetyczne, a mianowicie DNMT, może być korzystne w PZP (43–45). Te obserwacje, w połączeniu z wynikami badań opisanymi w dwóch poprzednich częściach autoreferatu, zainspirowały mnie do zaprojektowania szczegółowej analizy procesów komórkowych, na które wpływają inhibitory DNMT w GF.

Regulacja wzorców metylacji DNA bierze udział w kontroli odpowiedzi immunologicznej, a zaburzenia tego procesu ogrywają istotną rolę nie tylko w patofizjologii nowotworów, lecz również przewlekłych chorób autoimmunologicznych. W komórkach ssaków metylacja DNA jest katalizowana przez trzy enzymy należące do rodziny DNMT: DNMT1, DNMT3a i DNMT3b. DNMT1 odpowiada za odtwarzanie istniejących wzorców metylacji podczas replikacji DNA, natomiast DNMT3a i DNMT3b katalizują metylację *de novo* (6). **W artykule przeglądowym, który kompleksowo przedstawia aktualny stan wiedzy w tej dziedzinie, podsumowałem i omówiłem zaburzenia procesów epigenetycznych zidentyfikowane w PZP, w tym nieprawidłowe wzorce metylacji DNA (46).** Nieprawidłowości w profilach metylacji promotorów genów zaangażowanych w regulację stanu zapalnego, w tym *TLR2*, *PTGS2*, *IFNG*, *IL6*, *IL8* i *TNF*, zaobserwowano w tkance

dziąseł, krwi obwodowej lub błonie śluzowej policzka u pacjentów z PZP. Co ciekawe, niektóre z tych zmian nie tylko wykazywały ścisłe powiązanie z poziomem ekspresji mRNA regulowanych genów, lecz również ze stopniem zaawansowania choroby. Wykazano też, że patogeny jamy ustnej i cytokiny prozapalne indukują zmiany w ekspresji DNMT, jak również globalne i lokalne zmiany wzorców metylacji DNA w komórkach dziąseł i przyzębia. Konsekwencją opisanych zaburzeń procesów epigenetycznych jest nadmierna produkcja mediatorów stanu zapalnego lub zmniejszona skuteczność odpowiedzi immunologicznej przeciwko patogenom jamy ustnej. Mogą one zatem stanowić potencjalny mechanizm unikania aktywności układu odpornościowego gospodarza przez te gatunki bakterii.

Nieprawidłowe wzorce metylacji DNA, takie jak hipermetylacja genów supresorowych nowotworów, zostały zidentyfikowane w wielu typach nowotworów i, co istotne, niektóre z tych zmian mogą być skorygowane za pomocą drobnocząsteczkowych inhibitorów DNMT (47). Związki te działają jako odczynniki hipometylujące i wywołują epigenetyczną reaktywację wyciszonych genów. Przeciwnowotworowe działanie dwóch analogów cytydyny, 2'-dezoksy-5-azacytydyny (decytabiny) i 5-azacytydyny (AZA), zostało potwierdzone w wielu badaniach klinicznych i związki te zostały dopuszczone do leczenia zespołu mielodysplastycznego i ostrej białaczki szpikowej (48). Należy jednak zauważyć, że stosowanie inhibitorów DNMT w praktyce klinicznej jest ograniczone do terapii onkologicznych ze względu na znaczną toksyczność hematologiczną tych związków (49).

W tym kontekście niedawne badania *in vitro* i *in vivo* sugerujące, że inhibitory DNMT mogą wykazywać działanie terapeutycznie w PZP wydają się zaskakujące. W badaniach tych wykazano, że decytabina ogranicza resorpcję kości wyrostka zębodołowego w mysim modelu PZP, co prawdopodobnie jest wynikiem zahamowania osteoklastogenezy i zwiększonej produkcji cytokin przeciwzapalnych (43). W doświadczeniach *in vitro* inhibitory DNMT zapobiegały zaburzeniom integralności nabłonka dziąsłowego wywołanym zakażeniem *P. gingivalis* (45) oraz indukowały różnicowanie GF w kierunku funkcjonalnych osteoblastów wykazujących aktywność kościotwórczą (44). Chociaż w opisanych badaniach zidentyfikowano korzystne efekty indukowania hipometylacji DNA w komórkach dziąseł, nie poddano analizie potencjalnych negatywnych konsekwencji długotrwałej ekspozycji komórek na inhibitory DNMT. Co więcej, nie zbadano wpływu tych związków na wiele aspektów biologii GF istotnych w kontekście patogenezy PZP, w tym na proliferację, żywotność, aktywację zapalną i interakcje komórek z patogenami jamy ustnej.

Cel badania

Celem tego badania było kompleksowe scharakteryzowanie transkrypcyjnych i funkcjonalnych konsekwencji traktowania pierwotnych GF inhibitorami DNMT. Aby ocenić, w jakim stopniu inhibitory DNMT mogą wpływać na różne populacje fibroblastów tkanek przyzębia, część przeprowadzonych analiz rozszerzono również na fibroblasty więzadeł przyzębia (PDLF).

Wyniki

W celu zidentyfikowania aspektów biologii komórki, na które może wpływać zahamowanie aktywności DNMT, zastosowano połączenie sekwencjonowania RNA nowej generacji (ang. *next generation sequencing*, NGS) i analiz *in vitro* proliferacji, żywotności, aktywacji

zapalnej i interakcji GF z *P. gingivalis*. GF hodowano w obecności decytabiny przez 12 dni, co spowodowało znaczną redukcję globalnej metylacji DNA, potwierdzając tym samym aktywność biologiczną zastosowanego inhibitora w tym modelu badawczym.

W przeciwieństwie do leków epigenetycznych, które scharakteryzowano w badaniach opisanych w poprzednich częściach, traktowanie decytabiną zahamowało proliferację GF i wywołało nekrotyczną śmierć znacznej części komórek. Co ciekawe, w komórkach hodowanych w obecności decytabiny i poddanych infekcji *P. gingivalis* lub cytokinami prozapalnymi (TNF lub IL-1 β) zaobserwowano znaczące zwiększenie ekspresji i wydzielania chemokiny CCL20 w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Również bazalna oraz indukowana ekspresja MMP1 i kilku innych genów MMP była podwyższona w komórkach traktowanych decytabiną. Obserwacje te nie tylko umożliwiły zidentyfikowanie metylacji DNA jako ważnego mechanizmu regulującego ekspresję tych genów, lecz także sugerują, że hipometylacja DNA w GF może sprzyjać napływowi komórek układu immunologicznego, w tym limfocytów Th17, do tkanki dziąsła objętej stanem zapalnym oraz zwiększać stopień degradacji ECM. W celu potwierdzenia specyficzności zaobserwowanych efektów, w kolejnych doświadczeniach zastosowano dwa strukturalnie odmienne inhibitory DNMT1, AZA i 6-tioguaninę. Oba związki miały podobny wpływ na żywotność i aktywację zapalną GF jak decytabina, potwierdzając, że produkty degradacji lub niespecyficzna aktywność decytabiny nie były odpowiedzialne za obserwowane efekty. Warto podkreślić, że funkcjonalne konsekwencje hipometylacji DNA nie ograniczały się do GF, ponieważ podobne antyproliferacyjne i prozapalne działanie decytabiny zaobserwowano w PDLF. Dalsze badania wykazały też zwiększoną adherencję *P. gingivalis* do GF traktowanych decytabiną, co może ułatwiać kolonizację głębszych warstw tkanki przyzębia. Efekt ten był związany ze zwiększoną ekspresją mRNA i poziomem białka ICAM-1 (ang. *intercellular adhesion molecule-1*), które odgrywa kluczową rolę w adhezji bakterii do komórek gospodarza.

Aby uzyskać szerszy obraz procesów regulowanych przez metylację DNA w GF, przeprowadzono analizę transkryptomiczną metodą NGS w komórkach traktowanych decytabiną, a następnie poddanych infekcji *P. gingivalis*. Analiza ta potwierdziła, że decytabina powoduje globalne zmiany profilu ekspresji genów w GF. Około 80% spośród ponad 500 genów wrażliwych na decytabinę ulegało indukcji (w tym *CCL20*, *CCL5*, *CCL8*, *CCL13*, *TNF*, *IL1A*, *IL18*, *IL33* i *CSF3*). Wynik ten jest zgodny z mechanizmem działania inhibitorów DNMT powodującym hipometylację DNA, która zazwyczaj prowadzi do zwiększonej ekspresji genów. Następnie przeprowadzono analizę procesów regulowanych przez geny, których ekspresja ulegała statystycznie istotnym zmianom (ang. *pathway enrichment analysis*) w GF hodowanych w obecności decytabiny, które następnie zostały zakażone *P. gingivalis*. Analiza genów indukowanych przez decytabinę pokazała, że w największym stopniu są one związane z odpowiedzią immunologiczną i aktywacją zapalną komórki, w tym z takimi procesami jak: regulacja odpowiedzi interferonowej typu I, migracja limfocytów i sygnalizacja indukowana przez LPS. Co ciekawe, wiele genów związanych z tymi procesami ulegało indukcji w komórkach traktowanych decytabiną zarówno przy braku, jak i w obecności zakażenia *P. gingivalis*, co sugeruje, że hipometylacja DNA jest wystarczająca do aktywacji zapalnej GF nawet pod nieobecność dodatkowych czynników prozapalnych. Z kolei geny, których ekspresja ulegała obniżeniu w obecności decytabiny były głównie zaangażowane w organizację ECM i włókien kolagenowych. Wyniki te potwierdzają

i rozszerzają wnioski z eksperymentów opisanych powyżej. Pokazują one, że pomimo opisanego w literaturze potencjalnie korzystnego wpływu inhibitorów DNMT na niektóre procesy związane z patogenezą PZP, długotrwała ekspozycja komórek na te związki, która jest niezbędna dla ich aktywności biologicznej, ma również szkodliwy wpływ na GF. Zahamowanie metylacji DNA wykazuje również niekorzystne działanie na inne populacje fibroblastów, promując ich niekontrolowaną aktywację zapalną i zmniejszając ich potencjał do utrzymania homeostazy ECM.

Główne wnioski

- Inhibitory DNMT mają silne działanie anty-proliferacyjne i cytotoksyczne na GF oraz modulują ekspresję wielu grup genów, które sprzyjają rozwojowi stanu zapalnego i degradacji ECM oraz ułatwiają adhezję *P. gingivalis* do powierzchni komórki.
- Szkodliwy wpływ inhibitorów DNMT na proliferację i żywotność GF i PDLF, w połączeniu z indukcją mediatorów stanu zapalnego i enzymów degradujących ECM przez te związki, może znacznie ograniczyć ich potencjał terapeutyczny w PZP.
- **Pomimo potencjalnie negatywnych implikacji klinicznych wyniki tych badań wskazują na to, że inhibitory DNMT są doskonałym narzędziem do badania genów i procesów komórkowych podlegających regulacji przez metylację DNA w GF i innych typach komórek odgrywających istotną rolę w patogenezie PZP.**

Część 4

Hipermetylacja promotora TLR2 powoduje, że unieśmiertelnione fibroblasty dziąseł nie reagują na zakażenie *P. gingivalis*.

Lagosz-Cwik KB, Wielento A, ... **Grabiec AM.** hTERT-immortalized gingival fibroblasts respond to cytokines but fail to mimic primary cell responses to *Porphyromonas gingivalis*. *Sci Rep.* 2021;11(1):10770.

Wstęp

Jak opisano w części wprowadzającej, GF stanowią kluczowy komponent komórkowy tkanki dziąsła i ogrywiają istotną rolę w rozwoju i utrzymaniu przewlekłego stanu zapalnego w PZP, głównie poprzez wydzielanie dużych ilości cytokin, chemokin i enzymów degradujących ECM (22). Jednak zrozumienie wielu aspektów biologii GF istotnych w kontekście patogenezы PZP jest utrudnione ze względu na dużą zmienność pierwotnych linii GF pochodzącymi od różnych dawców (50) oraz relatywnie krótki czas życia komórek w hodowli *in vitro*. GF szybko ulegają starzeniu (ang. *senescence*), co jest związane ze zmniejszoną proliferacją, zwiększoną ekspresją inhibitorów cyklu komórkowego, dezorganizacją cytoszkieletu i rozregulowaniem produkcji ECM (51,52). Z tego powodu unieśmiertelnione linie GF, które mogłyby precyzyjnie odzwierciedlać reakcje komórek pierwotnych, stały się atrakcyjnym modelem dla wielu badaczy. Nadekspresja odwrotnej transkryptazy ludzkiej telomerazy (hTERT), która utrzymuje długość telomerów, jest jedną z najczęściej stosowanych strategii unieśmiertelniania ludzkich komórek (53). W porównaniu z innymi metodami unieśmiertelniania, nadekspresja hTERT zazwyczaj prowadzi do genetycznie stabilnych linii

komórkowych, które zachowują morfologię, profile ekspresji markerów specyficznych dla typu komórek i cechy funkcjonalne komórek pierwotnych (54).

Istnieją jednak dowody na to, że linie komórkowe unieśmiertelnione hTERT mogą utracić pewne właściwości fenotypowe unikatowe dla komórek pierwotnych, co powoduje, że te systemy nie są wiarygodne w niektórych badaniach funkcjonalnych (55). Wiadomo również, że proces unieśmiertelniania komórek może promować zmiany w profilach metylacji DNA, które znacząco wpływają na wiele aspektów biologii komórki (56). W unieśmiertelnionych ludzkich komórkach nabłonkowych zidentyfikowano globalną hipometylację genomową i/lub lokalne zmiany we wzorcach metylacji DNA, wpływające na geny zaangażowane w wiele procesów, w tym proliferację, naprawę uszkodzeń DNA, apoptozę, odpowiedź na traktowanie hormonami i inwazyjność (57–59). Te obserwacje jednoznacznie wskazują, że proces immortalizacji komórek może powodować zaburzenia regulacji epigenetycznej, chociaż zaobserwowano stosunkowo niewiele takich zmian w komórkach unieśmiertelnionych hTERT w porównaniu z liniami komórkowymi wytworzonymi przy użyciu alternatywnych metod (58).

Dostępna komercyjnie linia komórkowa GF (ang. *h-TERT-immortalized gingival fibroblasts*, TIGF) unieśmiertelniona za pomocą nadekspresji hTERT (T0026; Applied Biological Materials Inc., Richmond, BC, Kanada) jest wykorzystywana w wielu badaniach o charakterze podstawowym i translacyjnym ze względu na jej dostępność i dłuższą żywotność w porównaniu z komórkami pierwotnymi. Komórki TIGF są używane jako model w badaniach cytotoksyczności materiałów dentystycznych (60) oraz stanowią użyteczny element trójwymiarowych modeli tkanki dziąseł (61,62). Jednak dotychczas nie sprawdzono, czy TIGF można wykorzystać jako modelową linię komórkową do badania interakcji komórek gospodarza z patogenami jamy ustnej i czy w tej linii komórkowej występują istotne defekty epigenetyczne wpływające na jej funkcje.

Cel badania

Pierwszym celem przeprowadzonych badań była analiza aktywacji zapalnej TIGF w odpowiedzi na patogeny jamy ustnej i cytokiny prozapalne oraz porównanie jej z poziomami aktywacji obserwowanymi w pierwotnych liniach GF pochodzących od osób zdrowych. Drugim celem tej pracy było sprawdzenie, czy potencjalne defekty odpowiedzi TIGF na czynniki zapalne są związane ze zmianami epigenetycznymi.

Wyniki

Bezpośrednie porównanie aktywacji zapalnej TIGF z pierwotnymi liniami GF pokazało porównywalny poziom indukcji mediatorów stanu zapalnego po stymulacji TNF lub IL-1 β . W przeciwieństwie do tych obserwacji, produkcja IL-6, IL-8 i prostaglandyny E2 przez TIGF nie ulegała znaczącemu zwiększeniu po zakażeniu *P. gingivalis*. Podobne różnice zaobserwowano w regulacji poziomu mRNA mediatorów stanu zapalnego: transkrypty *IL6*, *IL8*, *COX2* i *mPGES1* były silnie indukowane w pierwotnych liniach GF, ale nie w linii TIGF poddanej zakażeniu *P. gingivalis*. Doświadczenia mające na celu wykrycie mechanizmu leżącego u podstaw tego zjawiska pokazały, że tylko stymulacja cytokinami, ale nie infekcja *P. gingivalis*, aktywowała sygnalizację kinaz MAP oraz czynnika transkrypcyjnego NF- κ B w TIGF. Wynik ten sugeruje, że zmiany na wczesnych etapach transdukcji sygnału lub na

etapie rozpoznawania bakterii przez komórkę są odpowiedzialne za zaobserwowany defekt aktywacji zapalnej TIGF.

Ponieważ receptor toll-podobny TLR2 (ang. *toll-like receptor-2*) odgrywa najważniejszą rolę w rozpoznawaniu *P. gingivalis* przez komórki gospodarza, zmierzono poziom tego receptora w TIGF. Analiza Western blot wykazała, że pierwotne linie GF produkują znaczne ilości białka TLR2, natomiast receptor ten był niewykrywalny w TIGF. Ta różnica była również widoczna na poziomie ekspresji mRNA i, w przeciwieństwie do komórek pierwotnych, ilość transkryptu *TLR2* w TIGF nie ulegała zwiększeniu po stymulacji cytokinami. Syntetyczne ligandy TLR2, Pam2CSK4 i Pam3CSK4, znacząco indukowały wytwarzanie IL-6 i IL-8 w pierwotnych liniach GF, podczas gdy ich wpływ na aktywację TIGF był znikomy. Wynik ten potwierdza brak zdolności do odpowiedzi na aktywatory TLR2 w TIGF. Warto zauważyć, że pierwotne linie GF i TIGF wykazują porównywalne poziomy ekspresji receptorów TLR4 oraz NOD-podobnych NOD1 i NOD2 (ang. *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors*), co sugeruje, że zaobserwowany defekt jest specyficzny dla TLR2.

Promotor genu *TLR2* zawiera dokładnie scharakteryzowane motywy ulegające metylacji, a zaburzenia tego procesu odnotowano w komórkach i tkankach pochodzących od pacjentów z PZP (63). Analiza przeprowadzona przy użyciu metody EpiTect methyl II PCR wykazała, że promotor *TLR2* był niemal całkowicie zmetylowany w TIGF, podczas gdy w pierwotnych liniach GF pozostawał w większości niezmetylowany. Hipermetylacja promotora *TLR2* najprawdopodobniej odpowiada za brak białka TLR2 w TIGF. Istnienie takiego defektu epigenetycznego tłumaczy też brak indukcji ekspresji TLR2 przez cytokiny prozapalne w TIGF pomimo obecności funkcjonalnych szlaków transdukcji sygnału aktywowanych pod wpływem stymulacji zapalnej.

Główne wnioski

- Unieśmiertelniona linia TIGF wykazuje defekt w ekspresji TLR2, który powoduje, że komórki te nie ulegają aktywacji zapalnej pod wpływem infekcji *P. gingivalis* lub stymulacji ligandami TLR2.
- TIGF mogą być jednak użytecznym modelem do badań procesów niezależnych od TLR2 ze względu na obecność funkcjonalnych szlaków transdukcji sygnału, które regulują transkrypcję mediatorów stanu zapalnego.
- **TLR2 jest niezbędny do aktywacji zapalnej GF w odpowiedzi na infekcję *P. gingivalis*, a ekspresja tego receptora podlega regulacji przez zmiany epigenetyczne w profilu metylacji DNA w GF.**
- Uzyskane wyniki podkreślają znaczenie przeprowadzania bezpośrednich porównań między komórkami unieśmiertelnionymi i pierwotnymi przed zastosowaniem tych pierwszych jako modeli komórkowych w badaniach procesów biologicznych.

Podsumowanie cyklu prac składających się na osiągnięcie naukowe

Wyniki mojej pracy badawczej opisane w niniejszym autoreferacie znacznie poszerzają zakres wiedzy na temat wpływu mechanizmów epigenetycznych na regulację funkcji biologicznych GF. Biorąc pod uwagę rosnącą świadomość znaczącej roli fibroblastów

w chorobach o charakterze przewlekłego stanu zapalnego (64), moje badania nie tylko umożliwiły szczegółowe scharakteryzowanie procesów komórkowych podlegających regulacji poprzez zmiany w metylacji DNA i acetylacji histonów, lecz także mogą pozwolić na identyfikację nowych kierunków dla terapii modulującej odpowiedź gospodarza w PZP. Przedstawione dane sugerują, że drobnocząsteczkowe inhibitory białek BET i HDAC, w szczególności HDAC3, wykazują silne właściwości przeciwzapalne, które mogą być korzystne w kontekście patogenezы PZP. Z drugiej strony, moje badania umożliwiły zidentyfikowanie potencjalnie szkodliwych konsekwencji blokowania metylacji DNA w GF i potwierdziły kluczową rolę regulowanej epigenetycznie ekspresji TLR2 w aktywacji GF w odpowiedzi na główny patogen chorób przyzębia, *P. gingivalis*. Opisane tutaj wyniki stanowiły również podstawę do zaprojektowania przeze mnie bardziej rozbudowanego programu badawczego mającego na celu scharakteryzowanie fizjologicznych i patologicznych ról HME w PZP. Projekt zatytułowany „Rola enzymów modyfikujących histony w epigenetyce i patogenezie paradontozy”, którego jestem autorem i kierownikiem, otrzymał finansowanie z programu NCN OPUS (2021/43/B/NZ5/03165, 2022-2026).

Bibliografia

1. Hajishengallis G, Chavakis T, Lambris JD. Current understanding of periodontal disease pathogenesis and targets for host-modulation therapy. *Periodontol 2000*. 2020;84(1):14–34.
2. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2014;15(1):30–44.
3. Botelho J, Machado V, Leira Y, Proença L, Chambrone L, Mendes JJ. Economic burden of periodontitis in the United States and Europe: An updated estimation. *J Periodontol*. 2022 Mar 30;93(3):373–9.
4. Preshaw PM. Host modulation therapy with anti-inflammatory agents. *Periodontol 2000*. 2018 Feb;76(1):131–49.
5. Berger SL, Kouzarides T, Shiekhataar R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev*. 2009 Apr 1;23(7):781–3.
6. Rothbart SB, Strahl BD. Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Aug;1839(8):627–43.
7. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*. 2012 May 29;13(7):484–92.
8. Tough DF, Tak PP, Tarakhovsky A, Prinjha RK. Epigenetic drug discovery: breaking through the immune barrier. *Nat Rev Drug Discov*. 2016;15(12):835–53.
9. Grabiec AM, Reedquist KA. The ascent of acetylation in the epigenetics of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2013 May 26;9(5):311–8.
10. Grabiec AM, Krausz S, de Jager W, Burakowski T, Groot D, Sanders ME, et al. Histone deacetylase inhibitors suppress inflammatory activation of rheumatoid arthritis patient synovial macrophages and tissue. *J Immunol*. 2010 Mar 1;184(5):2718–28.
11. Grabiec AM, Korchynskyi O, Tak PP, Reedquist KA. Histone deacetylase inhibitors suppress rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocyte and macrophage IL-6 production by accelerating mRNA decay. *Ann Rheum Dis*. 2012 Mar 27;71(3):424–31.
12. Angiolilli C, Grabiec AM, Ferguson BS, Ospelt C, Malvar Fernandez B, van Es IE, et al. Inflammatory cytokines epigenetically regulate rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocyte activation by suppressing HDAC5 expression. *Ann Rheum Dis*. 2016 Feb;75(2):430–8.

13. Angiolilli C, Kabala PA, Grabiec AM, Van Baarsen IM, Ferguson BS, García S, et al. Histone deacetylase 3 regulates the inflammatory gene expression programme of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Ann Rheum Dis*. 2017 Jan 25;76(1):277–85.
14. Angiolilli C, Kabala PA, Grabiec AM, Rossato M, Lai WS, Fossati G, et al. Control of cytokine mRNA degradation by the histone deacetylase inhibitor ITF2357 in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes: beyond transcriptional regulation. *Arthritis Res Ther*. 2018 Jul 20;20(1):148.
15. Furlan A, Monzani V, Reznikov LL, Leoni F, Fossati G, Modena D, et al. Pharmacokinetics, safety and inducible cytokine responses during a phase 1 trial of the oral histone deacetylase inhibitor ITF2357 (givinostat). *Mol Med*. 2011;17(5–6):353–62.
16. Vojinovic J, Damjanov N, D’Urzo C, Furlan A, Susic G, Pasic S, et al. Safety and efficacy of an oral histone deacetylase inhibitor in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum*. 2011 May;63(5):1452–8.
17. Ghasemi S. Cancer’s epigenetic drugs: where are they in the cancer medicines? *Pharmacogenomics J*. 2020 Jun;20(3):367–79.
18. Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol*. 2014 Jan;35(1):3–11.
19. Davidson S, Coles M, Thomas T, Kollias G, Ludewig B, Turley S, et al. Fibroblasts as immune regulators in infection, inflammation and cancer. *Nat Rev Immunol*. 2021;21(11):704–17.
20. Williams DW, Greenwell-Wild T, Brenchley L, Dutzan N, Overmiller A, Sawaya AP, et al. Human oral mucosa cell atlas reveals a stromal-neutrophil axis regulating tissue immunity. *Cell*. 2021 Jul 22;184(15):4090–104.
21. Wong ZY, Nee E, Coles M, Buckley CD. Why does understanding the biology of fibroblasts in immunity really matter? *PLoS Biol*. 2023 Feb;21(2):e3001954.
22. Wielento A, Lagosz-Cwik KB, Potempa J, Grabiec AM. The Role of Gingival Fibroblasts in the Pathogenesis of Periodontitis. *J Dent Res*. 2023 Mar 8;220345231151921.
23. Crowley T, Buckley CD, Clark AR. Stroma: the forgotten cells of innate immune memory. *Clin Exp Immunol*. 2018 Jul;193(1):24–36.
24. Filippakopoulos P, Knapp S. The bromodomain interaction module. *FEBS Lett*. 2012 Aug 14;586(17):2692–704.
25. LeRoy G, Rickards B, Flint SJ. The double bromodomain proteins Brd2 and Brd3 couple histone acetylation to transcription. *Mol Cell*. 2008 Apr 11;30(1):51–60.
26. Nicodeme E, Jeffrey KL, Schaefer U, Beinke S, Dewell S, Chung C-W, et al. Suppression of inflammation by a synthetic histone mimic. *Nature*. 2010 Dec 23;468(7327):1119–23.
27. Filippakopoulos P, Qi J, Picaud S, Shen Y, Smith WB, Fedorov O, et al. Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature*. 2010 Sep 24;468(7327):1067–73.
28. Klein K, Kabala PA, Grabiec AM, Gay RE, Kolling C, Lin L-L, et al. The bromodomain protein inhibitor I-BET151 suppresses expression of inflammatory genes and matrix degrading enzymes in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Ann Rheum Dis*. 2016 Feb;75(2):422–9.
29. Belkina AC, Denis G V. BET domain co-regulators in obesity, inflammation and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012 Jun 22;12(7):465–77.
30. Andrieu G, Belkina AC, Denis G V. Clinical trials for BET inhibitors run ahead of the science. *Drug Discov Today Technol*. 2016 Mar;19:45–50.
31. Meng S, Zhang L, Tang Y, Tu Q, Zheng L, Yu L, et al. BET Inhibitor JQ1 Blocks Inflammation and Bone Destruction. *J Dent Res*. 2014;93(7):657–62.
32. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*. 2011 Mar;21(3):381–95.

33. Yang X-J, Seto E. Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications. *Mol Cell*. 2008 Aug 22;31(4):449–61.
34. Zhang L, Lu Q, Chang C. Epigenetics in Health and Disease. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1253:3–55.
35. Grabiec AM, Tak PP, Reedquist KA. Function of histone deacetylase inhibitors in inflammation. *Crit Rev Immunol*. 2011 Jan;31(3):233–63.
36. Grabiec AM, Potempa J. Epigenetic regulation in bacterial infections: targeting histone deacetylases. *Crit Rev Microbiol*. 2018 May 4;44(3):336–50.
37. Roger T, Lugin J, Le Roy D, Goy G, Mombelli M, Koessler T, et al. Histone deacetylase inhibitors impair innate immune responses to Toll-like receptor agonists and to infection. *Blood*. 2011 Jan;117(4):1205–17.
38. Cantley MD, Dharmapatni AA, Algate K, Crotti TN, Bartold PM, Haynes DR. Class I and II histone deacetylase expression in human chronic periodontitis gingival tissue. *J Periodontal Res*. 2016 Apr 2;51(2):143–51.
39. Ateia IM, Sutthiboonyapan P, Kamarajan P, Jin T, Godovikova V, Kapila YL, et al. *Treponema denticola* increases MMP-2 expression and activation in the periodontium via reversible DNA and histone modifications. *Cell Microbiol*. 2018 Apr;20(4):1–17.
40. Yin L, Chung WO. Epigenetic regulation of human β -defensin 2 and CC chemokine ligand 20 expression in gingival epithelial cells in response to oral bacteria. *Mucosal Immunol*. 2011 Jul;4(4):409–19.
41. Martins MD, Jiao Y, Larsson L, Almeida LO, Garaicoa-Pazmino C, Le JM, et al. Epigenetic Modifications of Histones in Periodontal Disease. *J Dent Res*. 2016 Feb;95(2):215–22.
42. Cantley MD, Bartold PM, Marino V, Fairlie DP, Le GT, Lucke AJ, et al. Histone deacetylase inhibitors and periodontal bone loss. *J Periodontal Res*. 2011 Dec;46(6):697–703.
43. Tanaka U, Kajioka S, Finoti LS, Palioto DB, Kinane DF, Benakanakere MR. Decitabine Inhibits Bone Resorption in Periodontitis by Upregulating Anti-Inflammatory Cytokines and Suppressing Osteoclastogenesis. *Biomedicines*. 2021 Feb 17;9(2):199.
44. Cho Y, Kim B, Bae H, Kim W, Baek J, Woo K, et al. Direct Gingival Fibroblast/Osteoblast Transdifferentiation via Epigenetics. *J Dent Res*. 2017 May;96(5):555–61.
45. Barros SP, Hefni E, Fahimipour F, Kim S, Arora P. Maintaining barrier function of infected gingival epithelial cells by inhibition of DNA methylation. *J Periodontol*. 2020 Oct 7;91 Suppl 1(S1):S68–78.
46. Jurdziński KT, Potempa J, Grabiec AM. Epigenetic regulation of inflammation in periodontitis: cellular mechanisms and therapeutic potential. *Clin Epigenetics*. 2020 Nov 30;12(1):186.
47. Jin Z, Liu Y. DNA methylation in human diseases. *Genes Dis*. 2018 Mar;5(1):1–8.
48. Pechalrieu D, Etievant C, Arimondo PB. DNA methyltransferase inhibitors in cancer: From pharmacology to translational studies. *Biochem Pharmacol*. 2017 Apr 1;129:1–13.
49. Gao C, Wang J, Li Y, Zhao H, Li R, Hou L, et al. Incidence and risk of hematologic toxicities with hypomethylating agents in the treatment of myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2018 Aug;97(34):e11860.
50. Andrukhov O, Ertlschweiger S, Moritz A, Bantleon H-P, Rausch-Fan X. Different effects of *P. gingivalis* LPS and *E. coli* LPS on the expression of interleukin-6 in human gingival fibroblasts. *Acta Odontol Scand*. 2014 Jul;72(5):337–45.
51. Atkuru S, Muniraj G, Sudhaharan T, Chiam K-H, Wright GD, Sriram G. Cellular ageing of oral fibroblasts differentially modulates extracellular matrix organization. *J Periodontal*

- Res. 2021 Jan 23;56(1):108–20.
52. Páez J, Hernández R, Espinoza J, Rojas L, Martínez CE, Tobar N, et al. Uncoupled inflammatory, proliferative, and cytoskeletal responses in senescent human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res*. 2020 Jun 14;55(3):432–40.
 53. Lee KM, Choi KH, Ouellette MM. Use of exogenous hTERT to immortalize primary human cells. *Cytotechnology*. 2004 Jun;45(1–2):33–8.
 54. Kassem M, Abdallah BM, Yu Z, Ditzel N, Burns JS. The use of hTERT-immortalized cells in tissue engineering. *Cytotechnology*. 2004 Jun;45(1–2):39–46.
 55. Burgess JK, Ketheson A, Faiz A, Limbert Rempel KA, Oliver BG, Ward JPT, et al. Phenotype and Functional Features of Human Telomerase Reverse Transcriptase Immortalized Human Airway Smooth Muscle Cells from Asthmatic and Non-Asthmatic Donors. *Sci Rep*. 2018;8(1):805.
 56. Futscher BW. Epigenetic changes during cell transformation. *Adv Exp Med Biol*. 2013;754:179–94.
 57. Gao C, Xing X, He Z, Chen S, Wang S, Li Q, et al. Hypermethylation of PGCP gene is associated with human bronchial epithelial cells immortalization. *Gene*. 2018 Feb 5;642:505–12.
 58. Liu L, Zhang J, Bates S, Li J-J, Peehl DM, Rhim JS, et al. A methylation profile of in vitro immortalized human cell lines. *Int J Oncol*. 2005 Jan;26(1):275–85.
 59. Farwell DG, Shera KA, Koop JI, Bonnet GA, Matthews CP, Reuther GW, et al. Genetic and epigenetic changes in human epithelial cells immortalized by telomerase. *Am J Pathol*. 2000 May;156(5):1537–47.
 60. Illeperuma RP, Park YJ, Kim JM, Bae JY, Che ZM, Son HK, et al. Immortalized gingival fibroblasts as a cytotoxicity test model for dental materials. *J Mater Sci Mater Med*. 2012 Mar;23(3):753–62.
 61. Shang L, Deng D, Buskermolen JK, Roffel S, Janus MM, Krom BP, et al. Commensal and Pathogenic Biofilms Alter Toll-Like Receptor Signaling in Reconstructed Human Gingiva. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019 Aug 7;9(August):1–14.
 62. Shang L, Deng D, Buskermolen JK, Janus MM, Krom BP, Roffel S, et al. Multi-species oral biofilm promotes reconstructed human gingiva epithelial barrier function. *Sci Rep*. 2018 Dec 30;8(1):16061.
 63. Benakanakere M, Abdolhosseini M, Hosur K, Finoti LS, Kinane DF. TLR2 promoter hypermethylation creates innate immune dysbiosis. *J Dent Res*. 2015 Jan;94(1):183–91.
 64. Korsunsky I, Wei K, Pohin M, Kim EY, Barone F, Major T, et al. Cross-tissue, single-cell stromal atlas identifies shared pathological fibroblast phenotypes in four chronic inflammatory diseases. *Med (New York, NY)*. 2022 May 8;3(7):481-518.e14.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej:

Przed rozpoczęciem badań nad epigenetycznymi mechanizmami regulacyjnymi w PZP, moja działalność naukowa była afiliowana na Uniwersytecie w Manchesterze (2013-2016) oraz Uniwersytecie Amsterdamskim (2007-2013). Moje badania prowadzone w tym okresie koncentrowały się na molekularnych mechanizmach chorób o charakterze przewlekłego stanu zapalnego dotyczących takich narządów jak płuca i stawy.

Podczas stażu podoktorskiego realizowanego w Uniwersytecie w Manchesterze (Manchester, Wielka Brytania) badałem zaburzenia funkcji makrofagów pęcherzyków płucnych w przewlekłych zapalnych chorobach płuc i wirusowych infekcjach dróg oddechowych. Wyniki moich badań pozwoliły na zidentyfikowanie i funkcjonalne scharakteryzowanie białka Axl jako nieopisanego do tej pory receptora rozpoznającego komórki apoptotyczne w tych schorzeniach. Prowadzone przeze mnie badania koncentrowały się na regulacji usuwania komórek apoptotycznych przez makrofagi z płuc objętych stanem zapalnym. Regulacja tego procesu jest zaburzona w wielu przewlekłych chorobach płuc, takich jak astma i przewlekła obturacyjna choroba płuc. W ramach realizowanego projektu zidentyfikowałem receptor Axl jako kluczową cząsteczkę odpowiedzialną za usuwanie komórek apoptotycznych z oskrzeli objętych stanem zapalnym oraz scharakteryzowałem czynniki regulujące ekspresję Axl w mysich i ludzkich makrofagach, a także ich funkcjonalne konsekwencje (Grabiec i wsp., *Eur J Immunol* 2018, Fujimori i Grabiec i wsp., *Mucosal Immunol* 2015 [równorzędny wkład w publikację jako pierwszy autor]). Następnie rozszerzyłem moje obserwacje na komórki pochodzące od pacjentów i wykazałem, że Axl ulega selektywnej ekspresji w ludzkich makrofagach pęcherzyków płucnych, zaś poziom jego transkrypty jest znacząco obniżony u pacjentów z ciężką postacią astmy oskrzelowej (Grabiec i wsp., *J Allergy Clin Immunol*. 2017). Obserwacje te pozwoliły na zidentyfikowanie nowego mechanizmu odpowiedzialnego za zaburzenia w usuwaniu komórek apoptotycznych z dróg oddechowych pacjentów z przewlekłymi chorobami płuc. Wyniki te mają istotne implikacje kliniczne w kontekście niedawno zidentyfikowanej onkogennej funkcji białka Axl i trwających badań klinicznych inhibitorów Axl w nowotworach hematologicznych. Obserwacje te sugerują, że wszelkie próby systemowego blokowania aktywności Axl powinny być prowadzone z ostrożnością ze względu na potencjalne niepożądane efekty związane z nadmierną reakcją zapalną w infekcjach dróg oddechowych. Z kolei zastosowanie przeciwciał lub związków, które zapobiegają obniżaniu poziomu białka Axl (takich jak interferony typu I) może być korzystne w kontekście przewlekłych chorób płuc i zaostrzeń tych chorób związanych z infekcjami wirusowymi.

Moja praca nad tym projektem i liczne współprace, w które byłem zaangażowany w tym okresie, zaowocowały następującymi publikacjami (**we wszystkich przypadkach moja praca była afiliowana w Manchester Collaborative Centre for Inflammation Research**; mój wkład i dane bibliometryczne każdej publikacji są szczegółowo opisane w Podsumowaniu dorobku naukowego):

1. Pyle CJ, Patel DF, Peiró T, Joulia R, **Grabiec AM**, Hussell T, Tavernier G, Simpson A, Pease J, Harker JA, Lloyd CM, Snelgrove RJ. Matrix Metalloproteinase-12 Supports Pulmonary B Cell Follicle Formation and Local Antibody Responses During Asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2022;206(11):1424-1428.
2. Connolly E, Morgan DJ, Franklin M, Simpson A, Shah R, Brand OJ, Jagger CP, Casulli J, Mohamed K, **Grabiec AM**, Hussell T. Neurturin regulates the lung-resident macrophage inflammatory response to viral infection. *Life Sci Alliance.* 2020;3(12):e202000780.
3. Fujino N, Brand OJ, Morgan DJ, Fujimori T, **Grabiec AM**, Jagger CP, Maciewicz RA, Yamada M, Itakura K, Sugiura H, Ichinose M, Hussell T. Sensing of apoptotic cells through Axl causes lung basal cell proliferation in inflammatory diseases. *J Exp Med.* 2019;216(9):2184-2201.
4. Patel DF, Peiró T, Shoemark A, Akthar S, Walker SA, **Grabiec AM**, Jackson PL, Hussell T, Gaggar A, Xu X, Trevor JL, Li J, Steele C, Tavernier G, Blalock JE, Niven RM, Gregory LG, Simpson A, Lloyd CM, Snelgrove RJ. An extracellular matrix fragment drives epithelial remodeling and airway hyperresponsiveness. *Sci Transl Med.* 2018;10(455).
5. **Grabiec AM**, Goenka A, Fife ME, Fujimori T, Hussell T: Axl and MerTK receptor tyrosine kinases maintain human macrophage efferocytic capacity in the presence of viral triggers. *Eur J Immunol.* 2018;48(5):855-860.
6. **Grabiec AM**, Denny N, Doherty JA, Happonen KE, Hankinson J, Connolly E, Fife ME, Fujimori T, Fujino N, Goenka A, Holden S, Tavernier G, Shah R, Cook PC, MacDonald AS, Niven RM, Dahlbäck B, Fowler SJ, Simpson A, Hussell T. Diminished airway macrophage expression of the Axl receptor tyrosine kinase is associated with defective efferocytosis in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;140(4):1144-1146.
7. Weiss G, Lai C, Fife ME, **Grabiec AM**, Tildy B, Snelgrove RJ, Xin G, Lloyd CM, Hussell T. Reversal of TREM-1 ectodomain shedding and improved bacterial clearance by intranasal metalloproteinase inhibitors. *Mucosal Immunol.* 2017;10(4):1021-1030.
8. Hussell T, **Grabiec AM**. Immunopathology of lung diseases: introduction for the special issue. *Semin Immunopathol.* 2016;38(4):407-8.
9. **Grabiec AM**, Hussell T: The role of airway macrophages in apoptotic cell clearance following acute and chronic lung inflammation. *Semin Immunopathol.* 2016;38(4):409-23.
10. Fujimori T, **Grabiec AM**, Kaur M, Bell TJ, Fujino N, Cook PC, Svedberg FR, MacDonald AS, Maciewicz RA, Singh D, Hussell T. The Axl receptor tyrosine kinase is a discriminator of macrophage function in the inflamed lung. *Mucosal Immunol.* 2015;8(5):1021-30.

Moja aktywność naukowa na Uniwersytecie Amsterdamskim (Amsterdam, Królestwo Niderlandów) w okresie studiów doktoranckich (2007-2012) i stażu podoktorskiego (2012-2013) koncentrowała się na badaniach regulacji i funkcji deacetylaz histonów (HDAC) w patogenezie reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS) i na przedklinicznej ocenie potencjału terapeutycznego inhibitorów tych białek ze względu na ich właściwości przeciwzapalne. Oprócz dokładnego scharakteryzowania immunomodulacyjnych efektów inhibitorów HDAC w modelach *in vitro*, moje badania pozwoliły na scharakteryzowanie nieznanego wcześniej mechanizmu działania tych związków związanego z regulacją stabilności mRNA (Grabiec i wsp. *Ann Rheum Dis.* 2012, Angiolilli i wsp. *Arthritis Res Ther.* 2018). Dodatkowo w tym okresie byłem zaangażowany w wiele projektów związanych z analizą zaburzeń funkcji

fibroblastów błony maziowej w patogenezie RZS. W ramach tych badań zidentyfikowane zostały liczne komponenty wewnątrzkomórkowych szlaków transdukcji sygnału, w tym czynnik transkrypcyjny FoxO1, kinazy MAP i małe białka o aktywności GTPaz, których nieprawidłowa aktywacja przyczynia się do progresji stanu zapalnego w RZS. Moja praca nad tymi projektami zaowocowała następującymi publikacjami (we wszystkich przypadkach **moja praca była afiliowana w Akademickim Centrum Medycznym Uniwersytetu Amsterdamskiego**; mój wkład i dane bibliometryczne każdej publikacji są szczegółowo opisane w Podsumowaniu osiągnięcia naukowego):

Artykuły opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora:

1. Angiolilli C, Kabala PA, **Grabiec AM**, Rossato M, Lai WS, Fossati G, Mascagni P, Steinkühler C, Blackshear PJ, Reedquist KA, Baeten DL, Radstake TRDJ. Control of cytokine mRNA degradation by the histone deacetylase inhibitor ITF2357 in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes: beyond transcriptional regulation. *Arthritis Res Ther*. 2018;20(1):148.
2. Kabala PA, Angiolilli C, Yeremenko N, **Grabiec AM**, Giovannone B, Pots D, Radstake TR, Baeten D, Reedquist KA. Endoplasmic reticulum stress cooperates with Toll-like receptor ligation in driving activation of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Res Ther*. 2017;19(1):207
3. Angiolilli C, Kabala PA, **Grabiec AM**, van Baarsen IM, Ferguson BS, García S, Malvar Fernandez B, McKinsey TA, Tak PP, Fossati G, Mascagni P, Baeten DL, Reedquist KA. Histone deacetylase 3 regulates the inflammatory gene expression programme of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(1):277-285.
4. Angiolilli C, **Grabiec AM**, Ferguson BS, Ospelt C, Malvar Fernandez B, van Es IE, van Baarsen LG, Gay S, McKinsey TA, Tak PP, Baeten DL, Reedquist KA. Inflammatory cytokines epigenetically regulate rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocyte activation by suppressing HDAC5 expression. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(2):430-8.
5. Klein K, Kabala PA, **Grabiec AM**, Gay RE, Kolling C, Lin LL, Gay S, Tak PP, Prinjha RK, Ospelt C, Reedquist KA. The bromodomain protein inhibitor I-BET151 suppresses expression of inflammatory genes and matrix degrading enzymes in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(2):422-9.
6. **Grabiec AM**, Angiolilli C, Hartkamp LM, van Baarsen LG, Tak PP, Reedquist KA. JNK-dependent downregulation of FoxO1 is required to promote the survival of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2015;74(9):1763-71.
7. **Grabiec AM**, Reedquist KA. The ascent of acetylation in the epigenetics of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2013;9(5):311-8.

Artykuły opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora:

1. **Grabiec AM**, Korchynski O, Tak PP, Reedquist KA. Histone deacetylase inhibitors suppress rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocyte and macrophage IL-6 production by accelerating mRNA decay. *Ann Rheum Dis*. 2012;71(3):424-31.
2. de Launay D, van de Sande MG, de Hair MJ, **Grabiec AM**, van de Sande GP, Lehmann KA, Wijbrandts CA, van Baarsen LG, Gerlag DM, Tak PP, Reedquist KA. Selective involvement of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases in early rheumatoid arthritis (1987 ACR criteria compared to 2010 ACR/EULAR criteria): a prospective study aimed at identification of diagnostic and prognostic biomarkers as well as therapeutic targets. *Ann Rheum Dis*. 2012;71(3):415-23.

3. **Grabiec AM**, Tak PP, Reedquist KA. Function of histone deacetylase inhibitors in inflammation. *Crit Rev Immunol.* 2011;31(3):233-263.
4. de Launay D, Vreijling J, Hartkamp LM, Karpus ON, Abreu JR, van Maanen MA, Sanders ME, **Grabiec AM**, Hamann J, Orum H, Vervoordeldonk MJ, Fluiter K, Tak PP, Reedquist KA. Silencing the expression of Ras family GTPase homologues decreases inflammation and joint destruction in experimental arthritis. *Am J Pathol.* 2010;177(6):3010-24.
5. **Grabiec AM**, Reedquist KA. Histone deacetylases in RA: epigenetics and epiphenomena. *Arthritis Res Ther.* 2010;12:142.
6. Abreu JR, Krausz S, Dontje W, **Grabiec AM**, de Launay D, Nolte MA, Tak PP, Reedquist KA: Sustained T cell Rap1 signaling is protective in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2010;62(11):3289-99
7. **Grabiec AM**, Krausz S, de Jager W, Burakowski T, Groot D, Sanders ME, Prakken BJ, Maslinski W, Eldering E, Tak PP, Reedquist KA. Histone deacetylase inhibitors suppress inflammatory activation of rheumatoid arthritis patient synovial macrophages and tissue. *J Immunol.* 2010;184 (5):2718-28.
8. Abreu JR, de Launay D, Sanders ME, **Grabiec AM**, van de Sande MG, Tak PP, Reedquist KA. The Ras guanine nucleotide exchange factor RasGRF1 promotes matrix metalloproteinase-3 production in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Res Ther.* 2009;11:R121.
9. Abreu JR, **Grabiec AM**, Krausz S, Spijker R, Burakowski T, Maslinski W, Eldering E, Tak PP, Reedquist KA. The presumed hyporesponsive behavior of rheumatoid arthritis T lymphocytes can be attributed to spontaneous ex vivo apoptosis rather than defects in T cell receptor signaling. *J Immunol.* 2009;183(1):621-30.
10. **Grabiec AM**, Tak PP, Reedquist KA. Targeting histone deacetylase activity in rheumatoid arthritis and asthma as prototypes of inflammatory disease: should we keep our HATs on? *Arthritis Res Ther.* 2008;10:226.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących nauce:

- a) Działalność dydaktyczna – opieka nad doktorantami w charakterze promotora pomocniczego:

Katarzyna Łagosz-Ćwik (2018-2023) – doktorantka była zatrudniona w projekcie FIRST TEAM „*Epigenetics of periodontitis: DNA methylation in disease development and as a potential therapeutic target*” (POIR.04.04.00-00-5EDE/18-00), którego jestem kierownikiem. Przewidywany termin obrony doktoratu: październik 2023 r.

Aleksandra Wielento (2018-2023) – doktorantka zajmuje się badaniami roli cytrulinacji fimbrii w TLR2-zależnym przekazie sygnału podczas infekcji *P. gingivalis*. Przewidywany termin obrony doktoratu: grudzień 2023

Elwira Nieboga (2020-2024) - doktorantka zatrudniona w projekcie OPUS „*Synergistyczna aktywacja fibroblastów dziąsła przez patogeny jamy ustnej i zapalne środowisko tkanki jako nowy patomechanizm przewlekłego stanu zapalnego w paradontozie.*” (2019/35/B/NZ5/01823), którego jestem kierownikiem.

Aureliusz Schuster (2020-2024) - doktorant zatrudniony w projekcie OPUS „*Synergistyczna aktywacja fibroblastów dziąsła przez patogeny jamy ustnej i zapalne środowisko tkanki jako nowy patomechanizm przewlekłego stanu zapalnego w paradontozie.*” (2019/35/B/NZ5/01823), którego jestem kierownikiem.

Dominika Drapała (2022-2026) – doktorantka zatrudniona w projekcie OPUS „*Rola enzymów modyfikujących histony w epigenetyce i patogenezie paradontozy*” (2021/43/B/NZ5/03165), którego jestem kierownikiem.

b) Działalność dydaktyczna – promotor prac magisterskich i licencjackich:

2021:

Sławomir Dudek – praca magisterska: „*Wpływ patogenów jamy ustnej i środowiska zapalnego na mechanizmy epigenetyczne związane z metylacją DNA w komórkach dziąsła.*”

Maria Melnykova – praca licencjacka: „*Wpływ Porphyromonas gingivalis i czynników prozapalnych na kinetykę zmian ekspresji i stabilności mRNA w fibroblastach dziąsła.*”

2020:

Ewelina Gruca – praca magisterska: „*Analiza interakcji pomiędzy patogenami jamy ustnej i mediatorami stanu zapalnego w aktywacji pierwotnych ludzkich fibroblastów dziąsła.*”

Krzysztof Jurdziński – praca licencjacka: „*Epigenetyczne modyfikacje DNA w patogenezie zapalenia przyzębia: mechanizmy komórkowe i regulacja stanu zapalnego.*”

2019:

Agnieszka Bysiek – praca magisterska: „*Analiza regulacji i funkcji metylotransferaz DNA w fibroblastach dziąsła.*”

Sławomir Dudek – praca licencjacka: „*Wpływ Porphyromonas gingivalis i cytokin prozapalnych na ekspresję białek EZH2 i JMJD3 w pierwotnych fibroblastach dziąsła.*”

2018:

Justyna Macina – praca magisterska: „*Wpływ inhibitorów HDAC na aktywację zapalną fibroblastów dziąsłowych po infekcji Porphyromonas gingivalis.*”

Katarzyna Łagosz – praca magisterska „*Regulacja ekspresji i aktywności deacetylaz histonów przez Porphyromonas gingivalis i cytokiny prozapalne w ludzkich fibroblastach dziąsłowych.*”

2017:

Agnieszka Bysiek – praca licencjacka: „*Wpływ inhibitorów białek bromodomenowych na przeżywalność i aktywację keratynocytów dziąsła.*”

c) Działalność organizacyjna:

- Członek Rady Wydziału wybrany jako przedstawiciel niesamodzielnych pracowników naukowych (2020 – obecnie).
- Członek Komitetu Naukowego XLIX Szkoły Zimowej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii – ocena abstraktów i przewodniczenie sesji związanej z moją dziedziną badań.
- Organizacja Krakowskiego Interdyscyplinarnego Seminarium Naukowego (styczeń 2020) – mini-konferencji dla laureatów programów Fundacji na rzecz Nauki Polskiej pracujących na Uniwersytecie Jagiellońskim.

d) Popularyzacja nauki:

- Artykuł w popularyzatorskiej publikacji NCN podsumowującej efekty programu POLONEZ „*The POLONEZ experience – why it matters*” (str. 18-19):
https://ncn.gov.pl/sites/default/files/pliki/centrum-prasowe/Katalog_projektow_POLONEZ.pdf
- Artykuły popularnonaukowe na temat moich badaniach napisane na podstawie krótkich wywiadów:
„Ciemna strona stanu zapalnego”:
<https://www.bankier.pl/wiadomosc/Ciemna-strona-stanu-zapalnego-8231772.html>

„Analiza procesów epigenetycznych w przewlekłym zapaleniu przyzębia”:
<https://rzecz.pl/analiza-procesow-epigenetycznych-w-przewleklym-zapaleniu-pryzebia/>
- Podcast na temat pracy mojego zespołu opublikowany na portalu *Rzecz o Innowacjach* (grudzień 2021).
- Prezentacje na seminariach kół naukowych studentów biochemii i biotechnologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii (2017-2018).

7. Inne informacje dotyczące przebiegu kariery zawodowej wnioskodawcy:

a) Nagrody i stypendia:

- Nagrody naukowe tygodnika „*Polityka*” – finalista (2020)
- Polska Nagroda Inteligentnego Rozwoju 2020 w kategorii: „*Naukowiec Przyszłości*” (2020)
- Stypendium Ministra dla młodych wybitnych naukowców, Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (2018-2020)
- Nagroda za najlepszą prezentację ustną - *Early Career Physiologists' Symposium, Physiological Society Annual Meeting* (Cardiff, Wielka Brytania) (2015). Prezentacja zatytułowana: “*A key role for the Axl receptor tyrosine kinase expressed on airway macrophages in immune homeostasis of the lung.*”

b) Działalność naukowa i członkostwo:

- Członek International Association for Dental Research (od 2023)
- Redaktor pomocniczy (*associate editor*): *Frontiers in Immunology* (2022-obecnie) – 5 redagowanych artykułów
- Współredaktor gościnny zeszytu specjalnego w czasopiśmie *Seminars in Immunopathology* „[Immunopathology of lung diseases](#)” (2016)
- 42 zweryfikowane recenzje dla międzynarodowych czasopism, w tym *Arthritis Rheum*, *Arthritis Res Ther*, *Mol Med*, *J Clin Immunol*, *PNAS*, *Front Immunol*, *Front Pharmacol*, *Int Immunopharmacol*, *Pathogens*, *J Leukoc Biol*, *FEBS Open Bio*, *J Clin Periodontol*, *ACS Pharmacol Transl Sci*.

c) Profesjonalne szkolenia i certyfikaty:

- Kurs EMBO Laboratory Leadership for Group Leaders, Heidelberg, Niemcy (2022)
- Vitae Researcher Development Training Programme (efektywność, zarządzanie, skuteczna współpraca, komunikacja, własność intelektualna) (2018)
- Kurs *Laboratory Animal Science* (Uniwersytet w Utrechcie, Utrecht, Królestwo Niderlandów) (2009)

.....
(podpis wnioskodawcy)