

Marek Fol

Uniwersytet Łódzki
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

AUTOREFERAT

Łódź 2013

dr Marek Fol
Zakład Immunologii Komórkowej
Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej
Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki
ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź
tel.: 42 635-44-71, e-mail: marekfol@poczta.onet.pl

AUTOREFERAT

DOŚWIADCZENIE NAUKOWE:

- 1992 – 1997** studia magisterskie na kierunku biologia na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego
- 1997** magister biologii ze specjalnością mikrobiologia
temat pracy magisterskiej: „Wpływ BSA i FCS na działanie chemotaktyczne fMLP i jego estru metylowego w stosunku do makrofagów otrzewnej myszy.”
- 1997 – 2002** Stacjonarne Studium Doktoranckie Fizjologiczno – Mikrobiologiczne przy Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego
- 2002** doktor nauk biologicznych w dyscyplinie biologia, specjalność immunologia, uchwała Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego z dnia 25 czerwca 2002r. Temat rozprawy doktorskiej: „Produkcja tlenu azotu a wytwarzanie TNF- α i IL-6 przez makrofagi mysie stymulowane pałeczkami *Listeria* w obecności IL-12 lub IL-18.”

PRZEBIEG ZATRUDNIENIA ORAZ STAŻE W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH:

- 2000 – 2002** asystent w Katedrze Immunologii UŁ, później Katedrze Immunologii i Biologii Infekcyjnej
od 01.10.2002 adiunkt w Katedrze Immunologii i Biologii Infekcyjnej UŁ
- 2003 – 2007** staż naukowy post-doktorancki w University of Texas Health Science Center at Tyler, Biomedical Research, Tyler, TX, USA
- 05. – 09.2011** staż naukowy w University of Texas Health Science Center at Tyler, Department of Cellular and Molecular Biology, Tyler, TX, USA

PREZENTACJA AKTYWNOŚCI NAUKOWEJ:

Dotychczasowy całkowity dorobek naukowy obejmuje:

- **19 oryginalnych prac naukowych**, w tym 13 znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR); sumaryczny impact factor (IF) – 41,906
- **10 prac przeglądowych**, w tym 7 w czasopismach z listy JCR; sumaryczny impact factor – 2,730
- **1 referat** wygłoszony na konferencji krajowej
- **16 komunikatów zjazdowych**, w tym 8 prezentowanych na konferencjach międzynarodowych

Sumaryczny IF powyższych prac (wyliczony zgodnie z rokiem publikacji) wynosi **44,636** i odpowiada **358pkt** MNIŚzW. Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science: **203**; indeks Hirscha: **4**.

Dorobek naukowy obejmujący okres od uzyskania stopnia doktora do chwili obecnej:

- 15 oryginalnych prac naukowych, w tym 11 znajdujących się w bazie JCR; sumaryczny IF = 41,906
- 9 prac przeglądowych, w tym 6 w czasopismach z listy JCR; sumaryczny IF = 2,730
- 1 referat wygłoszony na konferencji krajowej
- 12 komunikatów zjazdowych, w tym 7 prezentowanych na konferencjach międzynarodowych

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl 6 publikacji (5 prac oryginalnych i 1 praca poglądowa) z lat 2006-2013, ujętych pod wspólnym tytułem: „**Czynniki warunkujące przeżywalność prątków gruźlicy w jednojądrzastych komórkach fagocytykujących gospodarza**”, których łączny IF = 20,047 (106pkt MNiSzW).

Prace oryginalne:

1. Chauhan A., Madiraju M.V.V.S., Fol M., Lofton H., Maloney E., Reynolds R., Rajagopalan M.: *Mycobacterium tuberculosis* cells growing in macrophages are filamentous and deficient in FtsZ rings. *J. Bacteriol.*, 2006, 188: 1856-1865
IF=3,993; 24pkt MniSzW
Wkład habilitanta: 20%; współudział w wykonaniu pracy eksperymentalnej związanej z oceną wpływu substancji SRI-3072 oraz środowiska wewnątrzmakrofagowego na powstawanie i formowanie struktur FstZ w komórkach M. tuberculosis, współudział w przygotowaniu manuskryptu.
2. Fol M., Chauhan A., Nair N.K., Maloney E., Moomey M., Jagannath C., Madiraju M.V.V.S., Rajagopalan M.: Modulation of *Mycobacterium tuberculosis* proliferation by MtrA, an essential two-component response regulator. *Mol. Microbiol.*, 2006, 60: 643-657
IF=5,634; 24pkt MNiSzW
Wkład habilitanta: 65%; współautor koncepcji pracy, wykonanie części eksperymentalnej (z wyjątkiem metod immunoblottingu i ChIP oraz analizy QRT-PCR), udział w opracowywaniu i interpretacji wyników, współprzygotowanie manuskryptu.
3. Maloney E., Stankowska D., Zhang J., Fol M., Cheng Q., Lun S., Bishai W.R., Rajagopalan M., Chatterjee D., Madiraju M.V.: The two-domain LysX protein of *Mycobacterium tuberculosis* is required for production of lysinylated phosphatidylglycerol and resistance to cationic antimicrobial peptides. *PLOS Pathogens*, 2009, 5, e1000534
IF=8,978; 24pkt MniSzW
*Wkład habilitanta: 25%; współautor koncepcji pracy, wykonanie i współudział w wykonaniu części eksperymentalnej obejmującej izolację lipidów oraz ich rozdział metodą chromatografii cienkowarstwowej (w tym izolacja lipidów z hodowli prowadzonych w obecności radioaktywnych znaczników), przygotowanie próbek lipidów do analizy cząsteczkowej w spektrometrze MALDI, ocenę wrażliwości badanych szczepów *M. tuberculosis* na wybrane antybiotyki kationowe, ocenę przeżywalności badanych szczepów *M. tuberculosis* w makrofagach oraz stopień kolokalizacji fagosomów zawierających prątki z markerem LAMP-1, współprzygotowanie manuskryptu.*
4. Fol M., Iwan-Barańska L., Stączek P., Krupiński M., Różalska S., Kowalewicz-Kulbat M., Druszczyńska M. Madiraju M.V.V.S., Kaczmarczyk D., Rudnicka W.: Interactions between an *M. tuberculosis* strain overexpressing mtrA and mononuclear phagocytes. *Adv. Med. Sci.*, 2013, 58: 172-183
IF=0,796; 15pkt MNiSzW

Wkład habilitanta: 65%; opracowanie koncepcji pracy, wykonanie pracy eksperymentalnej (ekspresja wybranych genów, ocena wrażliwości badanych szczepów M. tuberculosis na działanie katepsyny G, przygotowanie hodowli i preparatów mikroskopowych do oceny stopnia kolokalizacji fagosomów mykobakteryjnych z markerami Rab5 i Rab7), współudział i opieka nad pozostałą pracą eksperymentalną, opracowanie i interpretacja wyników, przygotowanie manuskryptu, autor korespondencyjny manuskryptu.

5. Foł M., Głobińska A., Stączek P., Kowalewicz-Kulbat M., Druszczyńska M., Madiraju M.V.V.S., Rudnicka W.: The lack of L-PG production and the repercussions of it in regards to *M. tuberculosis* interactions with mononuclear phagocytes. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, 2013, 60: 127-144
IF=0,646; 15pkt. MNiSzW

Wkład habilitanta: 65%; stworzenie koncepcji pracy, wykonanie części pracy eksperymentalnej (ekspresja wybranych genów, ocena wrażliwości badanych szczepów M. tuberculosis na działanie HNP1-3), współudział i opieka nad pozostałą pracą eksperymentalną, opracowanie i interpretacja wyników, przygotowanie manuskryptu, autor korespondencyjny manuskryptu.

Praca poglądowa:

6. Foł M.: *Mycobacterium tuberculosis* – jak przetrwać na wrogim terenie? *Post. Mikrobiol.*, 2008, 47: 387-392

IF= – ; 4pkt MNiSzW

Wkład habilitanta: 100%; przygotowanie koncepcji pracy, przygotowanie manuskryptu.

Nagroda Rektora Uniwersytetu Łódzkiego, indywidualna stopnia trzeciego, za cykl prac związanych z rozprawą doktorską pt. „Produkcja tlenu azotu a wytwarzanie TNF- α IL-6 przez makrofagi mysie stymulowane pałeczkami *Listeria* w obecności IL-12 lub IL-18.” 14 października 2004r.

**Badania stanowiące osiągnięcie naukowe zawarte w cyklu publikacji opatrzonym wspólnym tytułem:
„Czynniki warunkujące przeżywalność prątków gruźlicy w jednojądrzastych komórkach fagocytujących
gospodarza.”**

Głównym obiektem mojego zainteresowania naukowego po uzyskaniu stopnia doktora stały się prątki gruźlicy. Ten wewnątrzkomórkowy patogen bakteryjny stanowi fascynujący przykład wyrafinowanych oddziaływań, które wykształciły się na przestrzeni tysiącleci między gospodarzem (organizmem człowieka) a prątkiem gruźlicy (*Mycobacterium tuberculosis*). Szacuje się, iż przodek mykobakterii wchodzący w skład *Mycobacterium tuberculosis* complex zwany *M. prototuberculosis* pojawił się we wschodniej Afryce w czasie zbliżonym do pojawienia się form człowieka współczesnego, i odtąd stał się odwiecznym towarzyszem człowieka w jego migracjach i wędrówkach. Około 40 tysięcy lat temu wraz z ludźmi przedostał się do żyznego regionu Tygrysu i Eufratu, gdzie po 10-20 tys. lat wyewoluował w dwie podstawowe różne linie rozwojowe zwane: EAI (East African-Indian) i LAM (Latin American-Mediterranean). Szczególnie prątki należące do drugiej linii podążając za głównymi szlakami migracyjnymi ludzi 8-5000 lat temu stały się punktem wyjścia dla powstania w Afryce, Azji i Europie lokalnych szczepów i dalszego ich różnicowania. Szacuje się, iż obecnie około 1/3 światowej populacji człowieka jest zainfekowana *M. tuberculosis*. Do rozwoju gruźlicy dochodzi u około 5-10 % osób z tej populacji, a u pozostałych infekcja przebiega postać utajoną (latentną), bezobjawową. Nieleczona gruźlica, najczęściej płuc, kończy się śmiercią w ciągu średnio 4 lat od wystąpienia objawów. Przez wieki choroba budziła przerażenie prowadząc stopniowo do wyniszczenia organizmu. Nawet Hipokrates przestrzegał adeptów sztuki lekarskiej przed składaniem wizyt chorym na gruźlicę w jej późnym stadium gdyż ich nieuchronny zgon mógłby narazić na szwank reputację lekarską. Sytuację epidemiologiczną w zakresie zachorowań na gruźlicę zdecydowanie poprawiło zainicjowane w latach 20. ubiegłego wieku szczepienie szczepionką BCG oraz sukcesywne wprowadzanie kolejnych przeciwgruźliczych chemioterapeutyków, począwszy od streptomycyny wyizolowanej w 1943 roku. Podejmowane działania nie zmieniły jednak faktu, iż w skali światowej gruźlica nadal zbiera jedno z najobfitszych żniw spośród chorób zakaźnych (ok. 1.5 mln zgonów w skali roku na świecie) i razem z AIDS oraz malarią zaliczana jest przez WHO do tzw. „wielkiej trójki” powodującej największą liczbę zgonów. Niestety od połowy lat 80. dwudziestego wieku obserwuje się wyhamowanie dotychczasowego spadkowego trendu zachorowań oraz powolny wzrost liczby chorych na gruźlicę w skali światowej (z 8 mln w 1997 r. do 9,4 mln w 2008 r.). Polska w ostatnich Raportach Światowej Organizacji Zdrowia klasyfikowana jest wśród krajów o zachorowalności na gruźlicę w zakresie od 0 do 24, a więc najniższej. Przed popadaniem w złudne poczucie braku problemu zachorowań na tę chorobę powinna jednak chronić świadomość, iż nasz kraj, jako jeden z bardzo nielicznych w Unii Europejskiej, odznacza się odsetkiem zachorowań przekraczającym 20 przypadków na 100 000 osób. Liczba zachorowań różni się w poszczególnych regionach Polski, i tak w województwach zachodnich wynosi średnio 14/100 000/rok, podczas gdy w

łódzkim, lubelskim i świętokrzyskim – 35/100 000/rok. Gruźlica pozostaje w Polsce przyczyną ok. 32% zgonów rejestrowanych z powodu chorób zakaźnych. W świetle coraz intensywniejszych ruchów migracyjnych nie bez znaczenia jest również fakt, iż na całej długości wschodniej granicy Polska sąsiaduje z obszarami, na których odsetek zachorowań na gruźlicę należy do bardzo wysokich (50-150/100 000/rok) i najwyższych na świecie pod względem przypadków gruźlicy wywołanej przez szczepy odporne na podstawowe chemioterapeutyki (MDR, Multi-Drug Resistant). Niestety Polska dołączyła również do grupy kilkudziesięciu państw, w których do końca 2011 roku odnotowano przynajmniej jeden przypadek gruźlicy wywołanej szczepem XDR (Extensively Drug Resistant), a więc opornym nie tylko na izoniazyd i rifampicynę, ale również na jakikolwiek lek z grupy fluorochinolonów i przynajmniej jeden z trzech leków podawanych w formie iniekcji: amikacynę, kanamycynę lub kapreomycynę.

Obserwowana stagnacja w walce z gruźlicą, a w określonym wymiarze wręcz regres (pojawienie się szczepów MDR, XDR, oraz TDR (Total Resistant) może być pochodną nie tylko kwestionowanej coraz częściej skuteczności szczepionki BCG, ale także, a może wręcz przede wszystkim, pochodną specyficznych strategii *M. tuberculosis*, rozwiniętych przez tysiąclecia wzajemnego oddziaływania na styku gospodarz-drobnoustrój, pozwalających przetrwać im w niesprzyjającym środowisku jednojądrzastych fagocytów gospodarza, monocytów i makrofagów, pełniących, jak się uważa kluczową rolę w obronie przed tym patogenem. Za najważniejsze czynniki pozwalające prątkom gruźlicy skutecznie unikać mechanizmów odpornościowych gospodarza uważa się: ograniczenie fuzji fagosomów z lizosomami, ograniczenie wytwarzania tlenu azotu (NO) indukowanego IFN- γ oraz rekrutacji syntazy tlenu azotu (iNOS) w bezpośrednie sąsiedztwo fagosomów mykobakteryjnych, zapobieganie rozpoznawaniu zainfekowanych makrofagów przez limfocyty CD4+ poprzez zahamowanie procesów przetwarzania i prezentacji antygenów MHC klasy II, formowanie wokół mykobakteryjnych fagosomów "płaszczka ochronnego" z makrofagowego białka TACO. Gruntowne poznanie mechanizmów predysponujących prątki do przetrwania w organizmie gospodarza jest niezbędne dla skutecznego poszukiwania nowych przeciwgruźliczych preparatów szczepionkowych mogących w przyszłości uzupełnić działanie lub zastąpić dotychczas stosowaną szczepionkę BCG oraz dla efektywnego poszukiwania cząsteczek docelowych dla potencjalnych nowych preparatów przeciwpłatkowych.

Powyższe trendy znajdują swoje odzwierciedlenie w podjętych przeze mnie badaniach zainicjowanych podczas pobytu na stażu naukowym w University of Texas Health Science Center at Tyler (Teksas, USA) i kontynuowanych następnie w jednostce macierzystej – Zakładzie Immunologii Komórkowej, wchodzącym w skład Katedry Immunologii i Biologii Infekcyjnej Uniwersytetu Łódzkiego. Starając się lepiej poznać i zrozumieć mechanizmy umożliwiające prątkom przetrwanie w zainfekowanym organizmie, w oparciu o dostępną, ale ciągle niepełną w tym obszarze wiedzę, sformułowano następujące pytania:

- 1) jak różne warunki wzrostu prątków wpływają na funkcjonowanie białka FtsZ, kluczowego dla formowania przegrody komórkowej (septy) w trakcie podziału komórki *M. tuberculosis*, i uważanego za atrakcyjny „target” dla przeciwpłątkowych chemioterapeutyków,
- 2) czy dwukomponentowy system regulatorowy (2CR) MtrAB partycypuje w wewnątrzmakrofagowym przeżywaniu Mykobakterii,
- 3) czy *M. tuberculosis* posiada mechanizm pozwalający dokonywać modyfikacji lipidów osłony komórkowej, co zwiększałoby szanse na przeżywanie wewnątrz jednojądrzastych fagocytów gospodarza?

Białko FtsZ, odgrywające kluczową rolę w inicjowaniu i przebiegu procesu podziału komórki bakteryjnej, w tym *M. tuberculosis*, to wysoce konserwatywna cząsteczka, wykazująca pewien stopień homologii z tubuliną obecną u eukariontów. Występuje ono niemal u wszystkich bakterii, łącznie z tymi odznaczającymi się minimalnym genomem, jak np. *Mycoplasma genitalium*. Chociaż powszechnie przyjmuje się, iż białko FtsZ stanowi „siłę napędową” niezbędną dla formowania przegrody komórkowej w trakcie podziału komórki, to dotychczas niewiele wiadomo na temat tego czy i w jaki sposób środowisko makrofaga, w którym przebywa prątek po wnikięciu do wnętrza komórki fagocytarnej, oddziałuje na białko FtsZ, w szczególności na etap formowania pierścieni FtsZ wyznaczających miejsce podziału komórki. Zwrócenie uwagi na ten rodzaj cząsteczki wydaje się być tym bardziej zasadne, iż białko to mogłoby stać się atrakcyjnym miejscem docelowym dla nowo testowanych i poszukiwanych chemioterapeutyków przeciwpłątkowych. Aby odpowiedzieć na pytanie jak różne warunki wzrostu wpływają na funkcjonowanie białka FtsZ w komórkach *M. tuberculosis*, posłużono się mutantem *Mtb* wytwarzającym białko fuzyjne FtsZ-GFP (GFP - green fluorescent protein), będące źródłem FtsZ. Dzięki komponentce fluorescencyjnej możliwa stała się obserwacja mikroskopowa losów białka FtsZ w komórce bakteryjnej w trakcie hodowli bakterii w różnych warunkach. Namnażanie się *M. tuberculosis* wewnątrz komórki gospodarza jest kluczowe dla wirulencji, jednakże nie wiadomo czy w trakcie wzrostu prątków wewnątrz makrofagów dochodzi do jakichkolwiek oddziaływań w zakresie formowania pierścieni FtsZ. W badaniach wykazano, iż prątki *M.tb* z białkiem fuzyjnym FtsZ-GFP, izolowane z makrofagów pochodzących z 72h hodowli komórek monocytarnych THP-1, są dłuższe niż bakterie z hodowli płynnej prowadzonej w podłożu 7H9, co mogłoby sugerować ich defekt w zakresie podziałów komórkowych. Wydłużony fenotyp charakteryzował również komórki *Mtb* bez białka GFP. Należy zatem przyjąć, że elongacja komórek *Mtb* charakteryzuje prątki rozwijające się wewnątrzkomórkowo. W przeciwieństwie do prątków rosnących w hodowli płynnej, u większości komórek *Mtb* izolowanych z makrofagów THP-1 obserwowano od kilku do kilkunastu struktur ułożeniem przypominających spiralę („non-ring” structures) rozmieszczonych na całej długości komórki. Jedynie 1-3% komórek *Mtb* z hodowli makrofagowej posiadało pierścienie FtsZ w części centralnej. Biorąc pod uwagę, iż prątki namnażają się wewnątrz makrofagów należy rozumieć, iż owe „rozmyte” spiralne struktury są rodzajem pośrednich

form na drodze formowania się pierścieni FtsZ i w konsekwencji prowadzą do podziału komórki. Skoro białko FtsZ posiada właściwości GTPazy stwarza to możliwość, iż substancje o właściwościach inhibitorów GTPaz mogą okazać się punktem wyjścia dla nowych chemioterapeutyków przeciwgruźliczych, dla których efektywnym punktem docelowym będzie właśnie białko FtsZ. Konsekwencją działania takich substancji mogłoby być ograniczenie, jeśli nie całkowite zahamowanie, namnażania się *Mtb* w organizmie gospodarza. W przeprowadzonych badaniach przetestowano działanie substancji SRI-3072 z grupy zantryn, będącej niskocząsteczkowym inhibitorem GTPaz, należącej do klasy 2-alkoksykarbonylaminopirydyn. Zaobserwowano, iż wydłużeniu czasu ekspozycji na inhibitor (w stężeniu 0,56 μ M) do 24-120 godz. towarzyszyło zmniejszenie odsetka komórek *Mtb* posiadających centralnie zlokalizowany pierścień FtsZ oraz zwiększenie odsetka komórek o zwiększonej długości, przekraczającej niekiedy 6 μ m w dniu 5 ekspozycji. Szczegółowe dane zebrane po 48 godzinnej ekspozycji *Mtb* na badany preparat wykazały, iż jedynie u niewiele ponad 2% bakterii można było zidentyfikować jakiegokolwiek struktury FtsZ, podczas gdy takie struktury obserwowalne były aż u 7-krotnie większej liczby *Mtb* hodowanych w podłożu nie zawierającym SRI3072. Dodatkowo, u ponad 70% takich komórek struktury FtsZ zlokalizowane były w ich części centralnej, co może świadczyć o ich gotowości do podziału, a u 28% komórek umiejscowione były dystalnie sugerując, iż są to komórki, które niedawno powstały w wyniku podziału komórki macierzystej. Prątki gruźlicy poddane działaniu zantryny w ogóle nie wykazywały obecności struktur FtsZ w częściach dystalnych komórki, a jedynie w części centralnej. Może to nasuwać przypuszczenie, że obecność testowanej substancji rzeczywiście wpływa na efektywność podziału *Mtb*. Wyniki opublikowane zostały w *Journal of Bacteriology* (2006, 188: 1856-1865).

Wzrost i wirulencja *M.tuberculosis* wiązana jest również z funkcjonowaniem dwuskładnikowych systemów regulatorowych (2CR, two-component signal transduction system), za pośrednictwem których komórka bakteryjna odbiera sygnały ze środowiska zewnętrznego i w sposób adekwatny na nie reaguje. Okazuje się, iż ekspresja, a niewykluczone, że i regulacja, genów odpowiedzialnych za procesy replikacji DNA i podziału komórki może podlegać wpływom ze strony systemów 2CR. Dotychczas zidentyfikowano 11 takich systemów w komórkach *M. tuberculosis*. Każdy z nich składa się z pary obejmującej kinazę sensorową (najczęściej obecną w błonie komórkowej) i białko regulatorowe (obecne w cytozolu) odbierające od niej sygnał. Oba komponenty komunikują się ze sobą dzięki procesom fosforylacji, co w konsekwencji prowadzi do aktywacji białka regulatorowego, funkcjonującego zazwyczaj jako regulator transkrypcyjny. W ten sposób możliwa jest modulacja ekspresji określonych genów do poziomu odpowiedniego dla danych warunków. Spośród znanych systemów 2CR jedynie *mtrA-mtrB* jest absolutnie niezbędnym dla przeżycia komórek *Mtb*. Nasuwa się zatem pytanie w jaki sposób system *mtrA-mtrB* partycypuje w wewnątrzmakrofagowym przeżywaniu mykobakterii? Wiedząc, iż jego delecja ma efekt letalny posłużono się mutantem posiadającym podwyższony poziom białka regulatorowego MtrA (szczep Rv-78) oraz mutantem charakteryzującym się podwyższonym poziomem białka

regulatorowego z defektem w zakresie fosforylacji: MtrA_{DS3N} (kwas asparaginowy z pozycji 53 zastąpiony został asparaginą; szczep Rv-129). W podłożu płynnym 7H9, mutant Rv-78 wykazywał wzrost podobny do szczepu nieposiadającego modyfikacji, szczepu kontrolnego Rv-19. Radykalną zmianę zaobserwowano jednak w trakcie wewnątrzkomórkowego wzrostu badanych szczepów w makrofagach pochodzenia monocytarnego linii THP-1. Bakterie posiadające zwiększoną ekspresję *mtrA* odznaczały się zdecydowanie mniej intensywnym wzrostem w porównaniu ze szczepem kontrolnym sugerując, iż szczep Rv-78 ma charakter atenuowany. Atenuacja wzrostu zachowana była również w warunkach *in vivo*, kiedy w płucach i śledzionie zainfekowanych badanymi szczepami myszy odnotowano wyraźnie mniejszą, i stabilną od 14. dnia infekcji, liczbę CFU prątków, w porównaniu do zwierząt infekowanych w pełni zjadliwymi prątkami gruźlicy (ta część badań wykonywana była w Laboratorium Medycznym Katedry Patologii, University of Texas Health Sciences Center, Houston, TX, do którego to zadania zostałem tam oddelegowany). W przypadku szczepu Rv-129 posiadającego defekt w zakresie fosforylacji białka MtrA, jego wzrost odznaczał się częściową atenuacją w warunkach *in vitro* natomiast bardziej przypominał wzrost Rv-78 w warunkach *in vivo*. Nasuwa się pytanie, dlaczego podwyższenie poziomu białka MtrA skutkowało osłabieniem wzrostu badanych prątków w hodowlach prowadzonych *in vitro* w makrofagach i u infekowanych zwierząt natomiast pozostawało bez wpływu na ich wzrost w hodowlach płynnych? Niewykluczone, iż przyczyną tego stanu rzeczy jest to, iż sygnał odpowiedzialny za utrzymanie MtrA na odpowiednim poziomie fosforylacji występuje w ograniczonej ilości w podłożu płynnym, podczas gdy w trakcie infekcji i wewnątrzkomórkowego wzrostu jego ilość wzrasta, co przy zmienionym stosunku formy białka MtrA ufosforylowanej do nieufosforylowanej, będącej konsekwencją zwiększonej ekspresji genu *mtrA*, prowadzi do akumulacji formy ufosforylowanej i zakłóca określone procesy decydujące o efektywności podziałów komórkowych. Jednym z takich procesów może być zjawisko „dojrzewania” fagosomów zawierających pochłonięte komórki *M. tuberculosis*. Okazało się, iż w przypadku fagosomów z pochłoniętymi prątkami wykazującymi wzmożoną ekspresję *mtrA* dochodzi do efektywniejszego nabywania markerów późnych endosomów, co wykazano na przykładzie cząsteczki LAMP-1. Postępując się techniką mikroskopii konfokalnej uwidoczono, że w komórkach makrofagowych THP-1 infekowanych badanymi szczepami *Mtb*, fagosomy z mutantem Rv-78 podlegały częstszej kolokalizacji z markerem LAMP-1 (charakterystycznym dla późnych fagosomów) niż fagosomy zawierające w pełni zjadliwy szczep czy szczep z defektem w zakresie fosforylacji MtrA (odpowiednio: ok. 75%, 33%, 46%). Analogiczna sytuacja miała miejsce w przypadku kolokalizacji z innym markerem późnych fagosomów, mianowicie Rab7 (około: 65%, 36%, 53%). Zdolność prątków do przeżywania wewnątrz fagosomów jest kluczowa dla utrzymania infekcji. Jednym z podstawowych mechanizmów prątków gruźlicy mającym na celu zapewnienie przeżycia w obrębie komórki fagocytydującej jest właśnie blokowanie procesu dojrzewania fagosomów i w konsekwencji brak fuzji fagosomu z lizosomem prowadzącej do utworzenia fagolizosomu, w obrębie którego drobnoustrój mógłby zostać skutecznie zabity. Wzmożona kolokalizacja

mutanta Rv-78 z cząsteczkami późnych fagosomów świadczy, że zwiększonej ekspresji białka MtrA towarzyszy zmniejszenie zdolności Mtb do ograniczania dojrzewania fagosomów, tym samym skuteczniej mogą one łączyć się z lizosomami, co w konsekwencji prowadzi do wydajniejszego ograniczenia przeżywania takiego szczepu w fagocycie. Zmiana zatem stosunku formy ufosforylowanej do nieufosforylowanej białka MtrA może oddziaływać na ekspresję genów zaangażowanych w proces dojrzewania i formowania fagolizosomów (phagosome-lysosome trafficking pathway). Niewykluczone, że system *mtrA-mtrB* może wpływać również na inne procesy uczestniczące w przeżywaniu prątków. Stąd też pytania: czy zaobserwowane zmiany w kolokalizacji mutantów *mtrA* z markerami późnych endosomów, w porównaniu do wirulentnych prątków *Mtb* Rv-19, prowadzące do zwiększonej podatności na bójczy efekt makrofagów, powodowały zmiany w ekspresji antygenów zgodności tkankowej klasy II, co mogłoby wywoływać zmiany w prezentacji antygenów limfocytom i rozwoju odporności adaptacyjnej oraz czy zmniejszona przeżywalność Mtb towarzysząca wzmożonej ekspresji MtrA pozostaje w związku z intensywnością ekspresji genów makrofagowych kodujących indukowalną syntazę tlenu azotu (iNOS) i katepsynę G. Skuteczna eliminacja prątków gruźlicy wymaga bowiem współdziałania wielu mechanizmów immunologicznych. W przeprowadzonych badaniach, posługując się techniką cytofluorometrii przepływową (FACS) wykazano, iż wszystkie badane szczepy prątków obniżały zarówno zewnątrzkomórkową jak i wewnątrzkomórkową ekspresję cząsteczek MHC kl. II monocytów pochodzenia ludzkiego. Nie odnotowano jednakże różnic międzyszczepowych. Niebagatelną rolę w ograniczaniu infekcji bakteryjnych przypisuje się wytwarzaniu przez fagocyty aktywnych pochodnych azotu (np. tlenu azotu, NO), za co odpowiada enzym iNOS. Również białka kationowe, w tym katepsyna G, wytwarzane przez komórki gospodarza wykazują aktywność przeciwdrobnoustrojową. Posługując się techniką RT-PCR, w badaniach wykazano brak różnic statystycznie znamiennej w ekspresji genu kodującego katepsynę G (*catG*) w komórkach monocytów ludzkich izolowanych z krwi obwodowej i komórkach THP-1 infekowanych badanymi szczepami *Mtb*. Zwiększonej ekspresji białka MtrA nie towarzyszyła zwiększona wrażliwość szczepu na działanie egzogennej katepsyny G, co wykazano w doświadczeniach inkubując zawiesiny badanych szczepów w obecności różnych stężeń katepsyny G (10-100µg/ml, 24h). Nawet wydłużona inkubacja do 5 dni nie wpływała na stopień przeżywalności prątków *Mtb* hodowanych z katepsyną G obecną w podłożu w porównaniu do hodowli kontrolnych nie zawierających białka kationowego. Interesujące, iż po stymulacji prątkami nie udało się wykazać ekspresji genu kodującego iNOS. Również w supernatantach pohodowlanych nie wykryto obecności NO posługując się reakcją Griessa, co mogłoby potwierdzać, iż rzeczywiście nie doszło do indukcji ekspresji właściwego enzymu i pośrednio może świadczyć, że brak detekcji produktu RT-PCR nie wynikał z dysfunkcji układu badawczego. Istnieją doniesienia, iż stymulacja makrofagów pochodzenia ludzkiego nawet z użyciem wysokich dawek LPS i IFN-γ (odpowiednio 100ng/ml i 2500U/ml) nie doprowadza do powstania wykrywalnych ilości produktu RT-PCR genu kodującego iNOS (Am. J. Respir. Crit. Care Med.,

1998, 157: 1943-1950). Przeważająca ilość informacji odnoszących się do produkcji NO i mechanizmów regulujących ekspresję iNOS w komórkach monocytów/makrofagów pochodzi z badań prowadzonych na komórkach gryzoni lub liniach komórkowych pochodzących od gryzoni. W przypadku makrofagów pochodzenia ludzkiego pojawiają się liczne kontrowersje związane z wykazaniem efektywnej produkcji NO i ekspresji iNOS. Co zaskakujące, posługując się porównywalnymi technikami, w trakcie takich samych eksperymentów, w różnych niezależnych zespołach badawczych, niejednokrotnie uzyskuje się sprzeczne wyniki dotyczące zdolności ludzkich fagocytów jednojądrzastych do wytwarzania mierzalnych ilości NO i ekspresji iNOS szukając różnorodnych sposobów wytłumaczenia (Mol. Med., 1998, 4: 557-591; Handbook of Experimental Pharmacology: Nitric Oxide. ed. M.B. Heidelberg, Springer, 2000: 443-493). Skoro podwyższeniu ekspresji białka MtrA w komórce *Mtb* nie towarzyszą zmiany związane z ekspresją cząstek MHC klasy II na jednojądrzastych komórkach fagocytarnych, nie dochodzi do znaczących zmian w ekspresji białka kationowego katepsyny G, ani do zwiększonej podatności drobnoustroju na działanie egzogenne tego białka, a ekspresja iNOS w komórkach gospodarza pozostaje poza możliwościami detekcji metodą RT-PCR, inna próba wytłumaczenia obniżonej przeżywalności szczepu *Mtb* z nadekspresją *mtrA* (poza zwiększoną częstością fuzji fagocytów z markerami późnych endosomów) może wynikać z faktu potencjalnej regulacji białka DnaA przez MtrA. Pośrednio zatem, MtrA może oddziaływać na replikację mediowaną przez DnaA. Promotor genu *dnaA* jest cząsteczką wchodzącą w interakcję z MtrA i w warunkach *in vivo* ufosforylowane białko MtrA promuje transkrypcję *dnaA*. Z kolei białko DnaA jest kluczowe dla replikacji genu *oriC* a w konsekwencji dla przeżywania komórki bakteryjnej. Poziom MtrA i odpowiedni stosunek ilościowy formy ufosforylowanej tego białka do jego formy nieufosforylowanej oddziałuje na proces regulacji proliferacji i może decydować o przeżywalności *Mtb*. Zaburzenia w ilości białka MtrA bądź w proporcji jego formy nieufosforylowanej do ufosforylowanej mogłyby doprowadzać do zmian w transkrypcji *dnaA* i na przykład prowadzić do akumulacji nadwyżki produktu tego genu. Efektem zwiększonej podaży DnaA byłaby hiper-inicjacja transkrypcji *oriC* prowadząca do niewydolności syntezy DNA i akumulacji w komórce niekompletnych fragmentów nici DNA, co w konsekwencji prowadziłoby do osłabienia żywotności (Mol. Microbiol., 2003, 47: 755-765). Białko DnaA mogłoby również wpływać na ekspresję innych genów zaangażowanych w cykl życiowy komórki. Okazuje się, iż regiony promotorowe określonych genów zaangażowanych w procesy podziału komórki, np. *ftsK* i *ftsL* posiadają sekwencje mające zdolność wiązania DnaA. Białko to mogłoby więc działać jako regulator transkrypcyjny i oddziaływać na ekspresję tych genów (Microbiology, 2002, 148: 3887-3900). Zaburzenia związane z ekspresją MtrA przekładają się zatem na przeżywalność *Mtb*. Zagadnieniom tym poświęcone są dwie prace oryginalne wchodzące w skład omawianego osiągnięcia naukowego, opublikowane w *Molecular Microbiology* (2006, 60: 643-657) i w *Advances in Medical Sciences* (2013, 58: 172-183), oraz praca poglądowa, opublikowana w *Postęпах Mikrobiologii* (2008, 47:

387-392), prezentująca i omawiająca różne mechanizmy, którym przypisuje się znaczenie w przeżywaniu prątków w infekowanym organizmie gospodarza.

Rozpatrując przyczyny, dla których prątki z tak niebywałym sukcesem są w stanie długotrwale przetrwać w organizmie gospodarza, nie sposób pominąć aspektu związanego z ich wyjątkową, na tle innych mikroorganizmów bakteryjnych, budową ściany komórkowej, składającej się w dużej mierze z substancji lipidowych i ich pochodnych. Co ciekawe, należący do lipidów polarnych fosfatydyloglicerol (PG), powszechnie występujący u innych bakterii, u mykobakterii jest jednym ze słabiej reprezentowanych rodzajów lipidów, a z kolei odwrotna sytuacja dotyczy innego lipidu polarnego – kardiolipiny (CL). Na przykładzie *Staphylococcus aureus*, a później również m.in. *Listeria monocytogenes* i *Bacillus subtilis* wykazano, iż niektóre bakterie posiadają zdolność modyfikowania fosfatydyloglicerolu poprzez przyłączenie do niego cząsteczki L-lizyny z utworzeniem lizylo-fosfatydyloglicerolu (L-PG). Potencjalne znaczenie tego mechanizmu w odniesieniu do zdolności przeżywania prątków w komórce fagocytarnej gospodarza staje się istotne, jeśli weźmie się pod uwagę fakt, iż pierwotnie ujemnie naładowana cząsteczka PG nabiera w ten sposób ładunku dodatniego, a więc takiego samego jak wytwarzane przez komórki bójcze gospodarza antybakteryjne białka kationowe. W ten sposób oddziaływanie takich białek na powierzchnię komórki bakteryjnej staje się mniej efektywne, co w konsekwencji może sprzyjać przeżyciu prątka. W celu uzyskania odpowiedzi na pytanie czy prątek *M. tuberculosis* również posiada zdolność modyfikacji PG poprzez przyłączenie lizyny, a jeśli tak to, w jaki sposób może przełożyć się to na przeżywanie prątka wewnątrz komórek jednojądrzastych fagocytów, do badań użyto dwóch podstawowych mutantów *Mtb*, z których jeden posiadał delecję w obrębie genu fuzyjnego *lysX* (w jego obrębie znajduje się gen *mprF* odpowiedzialny za przyłączenie lizyny do PG u bakterii Gram-dodatnich) – nazwany *Mtb lysX*, natomiast drugi z mutantów – *Mtb compl* był szczepem komplementarnym, z ponownie wbudowanym genem *lysX*. Badania przeprowadzone z ich zastosowaniem (opublikowane w *PLoS Pathogens*, 2009, 5: e1000534 i *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 2013, 60: 127-144) wykazały, iż delecji genu *lysX* towarzyszyło osłabienie wzrostu wewnątrzkomórkowego prątków *Mtb* w hodowlach makrofagów pochodzenia monocytarnego krwi obwodowej jak i makrofagów linii komórkowej THP-1. Osłabioną zdolność wzrostu szczepu *Mtb* z delecją *lysX* ujawniły również badania *in vivo* z udziałem myszy i świnek morskich infekowanych wziewnie badanymi szczepami prątków. W homogenatach płuc izolowanych od obu gatunków zwierząt obserwowano mniejszą liczbę CFU szczepu *Mtb lysX* niż szczepu komplementarnego. W preparatach histologicznych tkanki płucnej zwierząt obu gatunków infekowanych szczepem posiadającym gen *lysX* obserwowano bardziej nasilone zmiany destrukcyjne i zapalne w porównaniu do tych będących efektem infekcji szczepem pozbawionym badanego genu. Mając na uwadze, iż cytokiny odgrywają niebagatelną rolę w regulacji reakcji obronnych i patologicznych postanowiono sprawdzić czy obserwowana u zakażanych zwierząt słabsza aktywność chorobotwórcza mutantów *Mtb lysX* mogła być związana ze

zmianą w makrofagowych cytokinach indukowanych przez bakterie? W supernatantach pochodzących z hodowli makrofagów infekowanych badanymi szczepami prątków określono poziom TNF- α i IL-10, kluczowych cytokin odpowiednio pro- i przeciwzapalnych, uwalnianych w trakcie odpowiedzi immunologicznej na zakażenie prątkiem gruźlicy, i o których w świetle najnowszych doniesień wiadomo, iż specyficzna równowaga ich stężeń definiuje mikrośrodowisko ziarniniaków gruźliczych (granuloma), co jest konieczne dla skutecznej kontroli infekcji w ich obrębie (*PLoS One*, 2013: 8: e68680). Ponadto zmierzono stężenie IL-6, niezbędnej dla formowania granuloma i uważanej za jedną z kluczowych cytokin w odporności nabytej (acquired immunity) na antygeny *Mtb* (*J. Infect. Dis.*, 2013, 207: 1253-1261). Okazało się, iż mutant pozbawiony genu *lysX*, w porównaniu do prątków posiadających ten gen, był silniejszym induktorem TNF- α i IL-6, ale nie IL-10. Dalsza analiza potencjalnych następstw związanych z delecją genu *lysX* w kontekście tak istotnych dla przebiegu infekcji procesów i mechanizmów jak ekspresja cząsteczek MHC kl. II, indukcja syntazy tlenu azotu, czy katepsyny G w komórkach jednojądrzastych fagocytów wykazała, iż mutacja w postaci usunięcia genu *lysX* nie powodowała zmiany w zdolności prątków gruźlicy do osłabiania ekspresji MHC kl. II na makrofagach ani nie doprowadzała do efektywnej ekspresji indukowalnej syntazy tlenu azotu. Obserwowano natomiast bardziej zintensyfikowaną ekspresję genu kodującego katepsynę G w komórkach tych fagocytów, które infekowane były szczepem *Mtb lysX*, niż szczepem niezmienionym. Mutant z delecją utracił ponadto zdolność hamowania dojrzewania fagosomów co wykazano w badaniach z użyciem mikroskopii konfokalnej, gdzie oceniano stopień ko lokalizacji prątków z fagosomami wykazującymi ekspresję markera LAMP-1, uważanego za marker fagosomów późnych. Powyższe wyniki wskazują, iż pozbawienie prątka gruźlicy genu *lysX* prowadzi do wyraźnego osłabienia jego zdolności do przeżywania wewnątrz komórki gospodarza. Jeśli gen *lysX* rzeczywiście odpowiada za modyfikację PG i w konsekwencji za dominację ładunku dodatniego na powierzchni komórki bakteryjnej to usunięciu genu i zmianie ładunku na ujemny powinna towarzyszyć zwiększona podatność na działanie substancji przeciwbakteryjnych o charakterze kationowym. Hipotezę tę zweryfikowano prowadząc hodowlę badanych szczepów *Mtb* w obecności dwóch wybranych antybiotyków o charakterze kationowym oddziałujących na strukturę ściany komórkowej bakterii, a mianowicie polimyksyny B i wankomycyny. Zaobserwowano, iż wzrost szczepu z usuniętym genem *lysX* przy dwóch najwyższych dawkach obu badanych związków (odpowiednio: 250 i 500 U/ml oraz 0,5 i 1 μ g/ml) był drastycznie ograniczony bądź zahamowany, podczas gdy wzrost prątka nie poddanego mutacjom i szczepu komplementarnego albo nie ulegał zmianie albo był osłabiony, jednakże w stopniu zdecydowanie słabszym niż miało to miejsce w przypadku szczepu *Mtb lysX*. Analogiczną sytuację stwierdzono dla hodowli prowadzonych w obecności defensyn HNP1-3 (human neutrophil peptides 1-3). Defensyny te stanowią najliczniejszą grupę przeciwbakteryjnych białek kationowych wytwarzanych przez komórki neutrofilów i w związku z tym przypisuje się im szczególną rolę w nieswoistych mechanizmach obronnych gospodarza (*Blood* 2006,

107: 2936–2942). Ponadto badania wykonane z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej pozwoliły ustalić, iż szczep pozbawiony genu *lysX*, charakteryzuje się utratą zdolności hamowania dojrzewania fagosomów, w przeciwieństwie do prątków *Mtb* niepoddanych mutacji i prątków komplementarnych. Ostateczną odpowiedź na pytanie, czy prątki *M. tuberculosis* rzeczywiście zdolne są do produkcji PG, a gen *lysX* odpowiada za lizynylację tego lipidu, dała wieloetapowa procedura izolacji i analizy lipidów tych bakterii. Prątki hodowano w podłożu płynnym m.in. z dodatkiem lub bez radioaktywnej lizyny (¹⁴C-lizyny) i kwasu octowego. Lipidy poddawano ekstrakcji w mieszaninie chloroform:metanol, a następnie rozdzielano na płytkach krzemionkowych metodą jedno- i dwukierunkowej chromatografii cienkowarstwowej (TLC) w mieszaninie rozpraszającej chloroform:metanol:woda. Wizualizacji lipidów dokonywano poprzez autoradiografię, ekspozycję na opary jodiny (uwidocznienie lipidów bez rozróżnienia charakteru ich dodatkowych komponent), oraz barwienie odczynnikami molibdenowym (wykrywanie lipidów z komponentą fosforanową), α-naftolem (wykrywanie lipidów z komponentą cukrową) lub barwienie ninhydryną (wykrywanie lipidów z komponentą aminokwasową). W wyniku tych zabiegów oraz zleconej analizie cząsteczkowej w spektrometrze MALDI (laserowa desorpcja i jonizacja próbki wspomagana matrycą) wyselekcjonowanych próbek lipidów udało się wykazać, iż lizyna wiązana jest do fosfatydyloglicerolu, co potwierdza rolę genu *lysX* w tym procesie oraz potencjał prątków gruźlicy do wytwarzania lizylofosfatyloglicerolu.

Wyniki składające się na osiągnięcie naukowe dotyczące czynników warunkujących przeżywalność prątków gruźlicy w jednojądrzastych komórkach fagocytujących gospodarza podsumować można następująco:

- Środowisko wewnątrzkomórkowe makrofagów oddziałuje na proces formowania pierścieni FtsZ w komórkach *M. tuberculosis*, w porównaniu do tego zachodzącego w hodowlach płynnych. Przejawem tego oddziaływania jest obserwowany „wydłużony” fenotyp prątków rozwijających się wewnątrzkomórkowo. Jest to prawdopodobnie związane z odkładaniem się białka FtsZ na całej długości komórki bakteryjnej w formie przypominającej spiralę, jednakże nie hamuje to samego procesu podziału bakterii, bowiem prątki namnażają się wewnątrz makrofagów.
- Białko FtsZ posiada potencjał by stać się atrakcyjnym celem dla nowych przeciwpątkowych chemioterapeutyków; obecność w środowisku wzrostu prątków niskocząsteczkowego inhibitora GTPaz z grupy zantryn, powodowało zmniejszenie odsetka komórek *Mtb* z centralnie zlokalizowanym pierścieniem FtsZ i podwyższenie odsetka komórek o zwiększonej długości.
- Kolejnym ważnym białkiem warunkującym przeżywalność prątków *Mtb* w makrofagach jest MtrA, wchodzące w skład dwuskładnikowego systemu regulatorowego *mtrA-mtrB*. Szczep ze zwiększoną ekspresją genu kodującego to białko wykazywał osłabienie wzrostu wewnątrz komórek makrofagowych, a dysfunkcja w zakresie fosforylacji tego białka doprowadzała do ograniczenia wzrostu prątków względem szczepu posiadającego niemodyfikowaną ekspresję i zdolność

przesyłania sygnału poprzez białko MtrA. Potwierdziły to badania *in vivo* wykonane na modelu mysim.

- Zwiększonej ekspresji genu *mtrA* towarzyszyła nasilona kolokalizacja prątków z fagosomami wykazującymi obecność późnych markerów endosomalnych LAMP-1 i Rab7, co przynajmniej częściowo mogłoby tłumaczyć osłabienie wewnątrzkomórkowego wzrostu *Mtb*.
- Infekcja jednojądrzastych fagocytów prątkami ze zwiększoną produkcją MtrA nie powodowała zmian w ekspresji przeciwbakteryjnego białka katepsyny G w komórkach gospodarza, pozostała też bez wpływu na wykrywalność indukowalnej syntazy tlenu azotu oraz nie doprowadzała do istotnych zmian w ekspresji cząsteczek MHC kl. II.
- Niezwykle ważną rolę w przeżywaniu wewnątrzkomórkowym prątków *Mtb* odgrywa gen *lysX*, odpowiedzialny za przyłączanie lizyny do fosfatydyloglicerolu, czego konsekwencją jest dominacja ładunku dodatniego na powierzchni komórki prętka.
- Delecja genu *lysX*, skutkująca zaburzeniem stosunku lipidów obdarzonych ładunkiem ujemnym i dodatnim, prowadziła do zwiększonej wrażliwości prątków na przeciwbakteryjne białka kationowe, takie jak HNP 1-3, a także na wankomycynę.
- Brak genu *lysX* powoduje osłabienie wzrostu *Mtb* wewnątrz makrofagów (badania *in vitro*) oraz zmniejszenie zmian destrukcyjnych i zapalnych powodowanych przez prątki w płucach (badania *in vivo*, model mysim).
- Mutant *Mtb* pozbawiony *lysX*, w porównaniu do wyjściowych prątków, był silniejszym induktorem TNF- α i IL-6, ale nie IL-10; delecja tego genu nie powodowała ponadto istotnych zmian w zdolności prątków gruźliczych do osłabiania ekspresji MHC kl. II na jednojądrzastych fagocytach pochodzenia ludzkiego oraz nie wpływała na ekspresję indukowalnej syntazy tlenu azotu w tych komórkach, w przeciwieństwie do ekspresji katepsyny G, której zwiększoną produkcję obserwowano.
- Gen *lysX* pozostawał w związku ze zdolnością prątków do hamowania dojrzewania fagosomów, szczep po utraceniu genu podlegał znamienne efektywniejszej kolokalizacji z fagosomami posiadającymi marker późnych endosomów LAMP-1.

Wyniki powyższych badań zostały opublikowane w 5 oryginalnych pracach naukowych (*J. Bacteriol.*, *Mol. Microbiol.*, *PLoS Pathog.*, *Adv. Med. Sci.*, *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*) oraz w 1 pracy poglądowej (*Post. Mikrobiol.*). Część wyników prezentowana była przeze mnie w formie referatu w trakcie XXVI zjazdu Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów (Szczecin, 2008).

Charakterystyka pracy naukowo-badawczej poprzedzającej osiągnięcie naukowe stanowiące monotematyczny cykl publikacji.

Efektorem podjętych przeze mnie studiów magisterskich na ówczesnym Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego było uzyskanie w 1997 roku stopnia magistra biologii, specjalność mikrobiologia. W trakcie trwania studiów otrzymałem dwa Listy Gratulacyjne Rektora UŁ (1995, 1996) za wyróżniające się wyniki w nauce, a na zakończenie - wyróżnienie w postaci „Medalu za Chlubne Studia”. Praca magisterska zatytułowana: „Wpływ BSA i FCS na działanie chemotaktyczne fMLP i jego estru metylowego w stosunku do makrofagów otrzewnej myszy” dotyczyła oceny wpływu albuminy surowicy bydlęcej (BSA, bovine serum albumin) oraz surowicy płodów cielęcych (FCS, fetal calf serum) na efektywność chemotaksji makrofagów otrzewnej myszy C57BL/6 indukowaną trójpeptydem formylo-metionilo-leucylo-feniloalaniny (fMLP) i estru metylowego fMLP. Otrzymane wyniki wskazały przede wszystkim, iż dodatek BSA lub FCS w podłożu jest konieczny dla ujawnienia się właściwości chemotaktycznych zarówno fMLP jak i jego estru metylowego. Najbardziej intensywna migracja kierunkowa makrofagów zachodziła pod wpływem fMLP w obecności 10% FCS. Sugerowano silniejsze działanie chemotaktyczne fMLP niż estru metylowego na makrofagi otrzewnej myszy, co mogło być związane ze stopniem powinowactwa receptorów znajdujących się na tych komórkach, do stosowanych chemoatraktantów. Nie wykluczone, iż znajdujące się w surowicy płodów cielęcych czynniki wzrostowe, taki jak np. M-CSF (czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów, macrophage colony stimulating factor), mogą zwiększać ekspresję receptorów dla fMLP.

Doktorat

Po zakończeniu studiów magisterskich, podjąłem studia doktoranckie (1997-2002; Stacjonarne Studium Doktoranckie Fizjologiczno – Mikrobiologiczne przy Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego). Część eksperymentalna pracy doktorskiej prowadzona była w ówczesnej Katedrze Immunologii, i stanowiła element głównego nurtu badawczego Katedry, obejmującego immunologiczne aspekty interakcji gospodarz-pałeczki *Listeria*. Prowadzone przeze mnie doświadczenia miały na celu zbadanie wzajemnych relacji między produkcją tlenu azotu (NO), czynnikiem wykazującym różnorodną aktywność biologiczną, w tym także silne działanie antybakteryjne, a wytwarzaniem przez stymulowane pałeczkami *Listeria* makrofagi wysięku otrzewnowego (PEMØ, peritoneal exudate macrophages) myszy C57BL/6 cytokin: TNF- α i IL-6, odgrywających ważną rolę w rozwoju reakcji zapalnej, jak również określenie wpływu egzogennej IL-12 i IL-18 na te procesy.

W badaniach oceniano intensywność produkcji tlenu azotu i IL-6 w przypadku zablokowania syntezy TNF- α przez pentoksyfelinę (PTX), i odwrotnie, produkcję TNF- α i IL-6 po zablokowaniu syntezy

NO przez metylo-L-argininę (L-NMMA, N^G-monomethyl-L-Arginine). Określano i porównywano stopień aktywności i działania IL-12 i IL-18 na przebieg produkcji badanych czynników.

Okazało się, iż całkowite zablokowanie produkcji NO pozostawało bez wpływu na wytwarzanie TNF- α i IL-6. Poziomu ich produkcji nie zmieniał także egzogeny tlenek azotu, którego źródłem był nitroprusydek sodu (SNP). Jednak zablokowanie wytwarzania TNF- α przez pentoksyfilinę (PTX, 5mM) spowodowało wyraźną redukcję (od 74,2% do 76,1%) produkcji NO i osłabienie sekrecji IL-6 (od 14,8% do 15,9%; spadek statystycznie nieznamienisty). Na zjawisko to nie wywierało żadnego wpływu obecność ani IL-12, ani IL-18 w podłożu, chociaż jak wykazano w pracy, IL-12 ma zdolność indukowania syntezy NO w makrofagach, bez współdziałania stymulatora bakteryjnego. Jej działanie okazało się mieć taką samą siłę jak pałeczki *Listeria*. Właściwości takiej nie wykazała IL-18. Stymulacja makrofagów pałeczkami *L. monocytogenes* lub *L. innocua* w obecności IL-12 (10ng/ml) była wyraźniej efektywna i prowadziła do zwiększenia o 91,8-84,6% produkcji NO, o 87,7-69,4% TNF- α , o 55,8-83,4% IL-6. Zastosowanie IL-18, w miejsce IL-12, nie spowodowało wzrostu produkcji żadnego z badanych czynników. Dopiero 10-krotnie wyższe stężenie IL-18 doprowadziło do lekkiego nasilenia syntezy NO, TNF- α i IL-6. Zaobserwowano, iż niezależnie od działania inhibitora syntazy tlenu azotu (L-NMMA), ani od obecności egzogenego źródła tlenu azotu, produkcja TNF- α i IL-6 przez makrofagi przebiega na tym samym poziomie, jednakże w wyniku inhibicji procesu wytwarzania TNF- α przez pentoksyfilinę dochodzi do silnego spadku produkcji NO (74,2%-76,1%) i na to zjawisko nie ma wpływu obecność ani IL-12, ani IL-18.

Całość uzyskanych przeze mnie wyników pozwoliła konkludować, iż egzogenna IL-12 wykazuje zdolność do indukcji syntezy NO w makrofagach wysięku otrzewnowego myszy C57BL/6, w takim samym stopniu jak zabite pałeczki *Listeria*; aktywność stymulacyjna rIL-12, w stosunku do produkcji wszystkich badanych czynników, jest kilkudziesięciokrotnie silniejsza od aktywności egzogennej rIL-18, i wreszcie, iż spadek sekrecji NO towarzyszący inhibicji syntezy TNF- α przez makrofagi stymulowane pałeczkami *Listeria*, sugeruje istnienie pewnego punktu styku w szlakach syntezy obu tych czynników. Prawdopodobnie jest nim wzrost poziomu cAMP, działającego inhibitorowo na czynnik transkrypcyjny NF- κ B, który uczestniczy w syntezie zarówno NO jak i TNF- α .

Praca doktorska pt.: „Produkcja tlenu azotu a wytwarzanie TNF- α i IL-6 przez makrofagi mysie stymulowane pałeczkami *Listeria* w obecności IL-12 lub IL-18”, której promotorem była prof. dr hab. Teresa Gościcka, została przeze mnie obroniona w dniu 11 czerwca 2002 roku. Przedłożony został ponadto wniosek o wyróżnienie niniejszej pracy doktorskiej stosowną nagrodą. Nagroda Rektora Uniwersytetu Łódzkiego, indywidualna stopnia trzeciego, przyznana została 14 października 2004r.

Krótki opis pracy naukowo-badawczej wykraczającej poza osiągnięcie naukowe stanowiące monotematyczny cykl publikacji.

Zainicjowana w 2009 roku współpraca z prof. Sylwią Kwiatkowską i jej grupą badawczą z zespołu Katedry Pulmonologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi pozwoliła rozbudować moje doświadczenie w pracy nad prątkami gruźlicy o badania dotyczące immunologicznego potencjału lokalnie występujących szczepów klinicznych. Współpraca ta stworzyła okazję uczestnictwa w badaniach mających na celu charakterystykę lokalnie występujących w regionie łódzkim (charakteryzującym się największym odsetkiem zachorowań na gruźlicę w Polsce) szczepów klinicznych *M. tuberculosis* pod względem ich wirulencji. Nowe techniki biologii molekularnej zmieniają sposób postrzegania ewentualnych zależności między patogennością a transmisją danych szczepów *Mtb* w populacji. Dysponując zbiorem ponad dwustu szczepów klinicznych prątków gruźlicy poddanych genotypowaniu z użyciem technik spoligotypowania, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) i MIRU (Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit) utworzono klastry pod względem podobieństw wzoru genetycznego wśród poszczególnych szczepów, jak i wyróżniono szczepy o unikalnym genotypie, niedającym przypisać się do żadnego z klastrów (kolekcja Uniwersytetu Medycznego w Łodzi). Przedmiotem badań było porównanie izolatów klinicznych *Mtb* należących do poszczególnych klastrów z tymi posiadającymi unikalne genotypy, w aspekcie ich wirulencji. W tym celu wykonano badania, w których określano wrażliwość poszczególnych szczepów na różne stężenia defensyny HNP-1, przeżywalność w makrofagach linii komórkowej pochodzenia ludzkiego THP-1, jak również określano intensywność wytwarzania tlenu azotu i IL-12 przez infekowane prątkami makrofagi wysięku otrzewnej myszy. Część wyników została już opublikowana w formie pracy oryginalnej, której jestem współautorem (na równych prawach z pierwszym autorem) w czasopiśmie *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* (2013, 17: 1082-1087), a kolejny artykuł został przesłany do druku w czasopiśmie *Tuberculosis*.

Możliwość kilkumiesięcznego wyjazdu w 2011r. do University of Texas Health Science Center at Tyler w Teksasie (USA) stworzyła okazję uczestnictwa w badaniach prowadzonych w Katedrze Biologii Komórkowej i Molekularnej, kierowanej przez dr Annę Kurdowską. Obecność w jej zespole była okazją do poszerzenia mojej wiedzy o pozaprawkowe procesy immunologiczne zachodzące w płucach, związane z patogenezą i przebiegiem ostrego uszkodzenia płuc (ALI, acute lung injury) i ostrej niewydolności oddechowej (ARDS, acute respiratory distress syndrome). Zespół ten jest jednym z pionierskich, w których podjęto badania nad wiązaniem IL-8 z α -2 makroglobuliną (obecną w osoczu i płynach płucnych osób z ciężkim uszkodzeniem płuc) oraz pierwszym, który opisał powstawanie kompleksów immunologicznych składających się z cząsteczki IL-8 i autoprzeciwciała skierowanego przeciwko tej cytokinie (anty-IL-8:IL-8), w płynach płucnych od osób z ARDS. Efektem badań, do których zostałem włączony jako członek zespołu, było ustalenie, iż powstające w trakcie wspomnianych procesów

chorobowych kompleksy immunologiczne, stymulują neutrofile doprowadzając do uruchomienia kaskady sygnałowej związanej z TLR4, angażując jednocześnie receptory FcγRIIa. Wykazano, iż istnieje molekularna kooperacja między tymi dwoma receptorami na poziomie cząsteczki kinazy Btk (Bruton's tyrosine kinase). Kolejny kierunek badań dotyczył interakcji między obecną w płynie płucnym urokinazą (uPa, proteazą serynową katalizującą przekształcenie plazminogenu do plazminy) a α_2 -makroglobuliną (α_2 -M, glikoproteiną o właściwościach inhibitora proteinaz). U osób dotkniętych ALI/ARDS obserwuje się niższy poziom uPA w płynie płucnym, w porównaniu do osób zdrowych, a α_2 -M stanowi jeden z głównych składników tego płynu. Obie te cząsteczki mogą tworzyć kompleksy. Okazało się, iż kompleksy takie oddziałując na komórki epitelialne doprowadzają do hamowania aktywacji czynnika NF- κ B oraz tłumienia produkcji IL-6 i IL-8. W efekcie związania α_2 -M przez uPA może dochodzić do modulacji działania urokinazy, wyrażającej się regulacją jej właściwości fibrynolitycznych i sygnałowych. Moim udziałem w prowadzonych badaniach była izolacja i ocena aktywności neutrofilów w środowisku wybranych stymulatorów, hodowla i preparatyka komórek linii BEAS-2B (ludzkie komórki nabłonka oskrzeli, human bronchial epithelial cells) wraz z oceną wybranych markerów powierzchniowych komórek i białek wewnątrzkomórkowych metodami immunofluorescencji, analiza cienkowsarstwowych preparatów tkanek technikami mikroskopii konfokalnej oraz ogólnie przygotowywanie dokumentacji i interpretacja uzyskiwanych wyników badań. Udział w projekcie (współpraca trwa do chwili obecnej) pozwolił mi rozszerzyć warsztat naukowy jak i udoskonalić bądź nabyć umiejętność posługiwania się określonymi technikami. Część wyników została już opublikowana w dwóch pracach oryginalnych (*Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2012, 303: L1037-L1045, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2013, 48: 240-249), a kolejne są w recenzji i przygotowaniu.

Nawiązanie współpracy z zespołem badawczym Instytutu Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi, prowadzącym wielokierunkowe badania nad biologicznymi funkcjami prątków gruźlicy, pozwoliło wzbogacić mój obszar badawczy o nowe aspekty związane z oceną wpływu interakcji między IL-8 a *Mycobacterium tuberculosis* na zdolność makrofagów i neutrofilów do fagocytozy i wewnątrzkomórkowego zabijania tych drobnoustrojów. Okazuje się, iż IL-8 jest w stanie wiązać się do powierzchni tych drobnoustrojów, co z kolei może wpływać na odpowiedź immunologiczną makroorganizmu na zakażenie prątkami gruźlicy. W zwalczaniu infekcji *Mtb* niezwykle ważną rolę odgrywają komórki fagocytarne (makrofagi i neutrofile), a rozwój gruźlicy wynika w znacznym stopniu z ograniczonej odpowiedzi przeciwzakaźnej gospodarza. Interleukina 8 jest cytokiną należącą do grupy CXC chemokin. Ze względu na swoje właściwości chemotaktyczne oraz aktywujące komórki takie jak: monocyty, neutrofile i limfocyty, wydaje się być ona ważnym elementem prawidłowej odpowiedzi immunologicznej na zakażenia *Mtb*. Analiza wpływu interakcji pomiędzy IL-8 a prątkami *Mtb* na zdolność makrofagów i neutrofilów do fagocytozy i wewnątrzkomórkowego zabijania bakterii, przy wykorzystaniu metod badawczych obejmujących techniki immunologiczne, biochemiczne, mikrobiologiczne i

fluorescencyjne wykazała, że makrofagi i neutrofile intensywniej pochłaniają prątki opłaszczony IL-8 w porównaniu z bakteriami nieopłaszczonymi. Wyniki sugerują, że zarówno makrofagi jak i neutrofile krwi obwodowej wydają się być bardziej zaaktywowane do wewnątrzkomórkowego zabijania prątków gruźlicy związanych z IL-8 niż bakterii nieopłaszczonych tą chemokina. Można zatem sugerować, iż pochłanianie prątków gruźlicy opłaszczonych IL-8 wydaje się wzmacniać aktywację fagocytów i intensyfikować ich zdolności do ograniczania wewnątrzkomórkowego namnażania się bakterii oraz, że interakcja pomiędzy IL-8 i prątkami gruźlicy może wpływać na zmianę mechanizmów wrodzonej odporności w gruźlicy i uruchomienie odpowiednich szlaków aktywacji fagocytów uzależnionych od IL-8. W dalszej kolejności podjęto się oceny wpływu opłaszczenia interleukiną 8 prątków *Mtb* na poziom ekspresji wybranych receptorów obecnych na komórkach fagocytarnych, wchodzących w interakcję z powierzchnią komórki bakteryjnej, a mianowicie: TLR2, TLR4, MMR i CCR3. Badania te prowadzone są z zastosowaniem techniki cytometrii przepływowej (FACS). Udział mój w przedstawionym projekcie obejmuje bezpośrednie planowanie i wykonawstwo lub współwykonawstwo poszczególnych eksperymentów oraz analizę i interpretację wyników. Efektem dotychczasowej współpracy jest powstanie dwóch publikacji, których jestem drugim autorem, przesłanych do redakcji *Clinical Science* i *Journal of Clinical Immunology*.

Istotnym elementem prezentowanego dorobku naukowego jest szereg publikacji poglądowych, których jestem autorem bądź współautorem. Tematyka tych prac, choć zróżnicowana, stanowi spójną całość odzwierciedlającą obszar moich zainteresowań. Dwie najwcześniejsze prace poświęcone są makrofagom, a w szczególności ich receptorom, (*Post. Hig. Med. Dośw.*, 1995, 53: 807-822) oraz interleukinie 18 (*Post. Hig. Med. Dośw.*, 2003, 57: 685-699). W kolejnych prezentowano przede wszystkim różne aspekty oddziaływań na linii prątek gruźlicy-komórka fagocytująca gospodarza, czego wyrazem są m.in. prace omawiające rozpoznawanie antygenów prątków przez fagocyty (*Post. Hig. Med. Dośw.*, 2011, 65: 28-39), receptory makrofagów wchodzące w interakcje z prątkami (*Sepsis*, 2010, 3: 209-2013), patogenезę, diagnostykę i leczenie latentnych form infekcji *M. tuberculosis* (*Pol. J. Microbiol.*, 2012, 61: 3-10), a także mechanizmy umożliwiające przetrwanie prątkom gruźlicy w gospodarzu (*Post. Mikrobiol.*, 2008, 47: 387-392, stanowi część głównego osiągnięcia naukowego). Zagadnieniom związanym z obecnie stosowaną szczepionką BCG jak i najnowszym trendom w poszukiwaniu nowych przeciwpątkowych preparatów szczepionkowych poświęcone zostały prace opublikowane w *Post. Hig. Med. Dośw.* (2011, 65: 93-103) i w *Zakażeniach* (2013, 3: 80-84). Swoistym urozmaiceniem i poszerzeniem omawianych zagadnień jest praca odnosząca się do prątków niegruźliczych, krótko charakteryzująca wybrane gatunki i zmiany kliniczne przez nie wywoływane (*Post. Hig. Med. Dośw.*, 2011, 65: 574-583).

Procesy immunologiczne związane z przebiegiem infekcji prątkami *M. tuberculosis* nadal pozostają w głównym nurcie moich zainteresowań badawczych. Szczególną uwagę zwraca IL-18,

nasilająca rozwój przeciwprątkowej odpowiedzi typu Th1, którą uważa się za kluczową w odporności na gruźlicę. Jej potencjalne użycie w ograniczaniu reaktywacji gruźlicy w zakażeniach latentnych wydaje się być interesującym obszarem badawczym, któremu zamierzam poświęcić obecnie szczególną uwagę.



.....
(podpis)