

dr Magdalena Kowalewicz-Kulbat

AUTOREFERAT

Zakład Immunologii Komórkowej
Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej
Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii
Uniwersytet Łódzki

Łódź, lipiec 2018

Autoreferat

1. Imię i nazwisko: **Magdalena Kowalewicz-Kulbat**

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytuł rozprawy doktorskiej

2000r dyplom magistra biologii w specjalności mikrobiologia, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Łódzki. Temat pracy magisterskiej „Reaktywność surowic pacjentów z dyspepsją, gruźlicą i chorobą wieńcową oraz zdrowych krwiodawców z antygenem *Helicobacter pylori*” oraz antygenem Hsp65 *Mycobacterium bovis* BCG”, Promotor prof. dr hab. Wiesława Rudnicka

2005r dyplom doktora nauk biologicznych w zakresie biologii, nadany uchwałą Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego z dnia 22 marca 2005r. Temat rozprawy doktorskiej „Dendritic cells as the cells presenting bacterial antigens in immunological hypersensitivity”. Promotor prof. dr hab. Wiesława Rudnicka

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych

2000-2005- **doktorant** Stacjonarnego Studium Doktoranckiego Fizjologiczno-Mikrobiologicznego Uniwersytetu Łódzkiego, Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej Uniwersytetu Łódzkiego

10.10.2003-2005-**asystent** w Katedrze Immunologii i Biologii Infekcyjnej Uniwersytetu Łódzkiego

10.07.2005-obecnie **adiunkt** w Zakładzie Immunologii Komórkowej Katedry Immunologii i Biologii Infekcyjnej Uniwersytetu Łódzkiego

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust.2 z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz.595 ze zm.):

4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

„Synapsa immunologiczna ludzkiej komórki dendrytycznej z limfocytym T formowana w odpowiedzi na prątki *Mycobacterium bovis* BCG”

Przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe stanowi monotematyczny cykl 10 publikacji (8 prac oryginalnych i 2 prace przeglądowe) z lat 2006-2018, których sumaryczny **IF wynosi= 16,463** (zgodnie z rokiem opublikowania), sumarycznej liczbie punktów **MNiSW 190 pkt** (zgodnie z rokiem opublikowania) (200 pkt MNiSW wg wykazu z dnia 9.12.2016) i sumarycznej liczbie cytowań 128, bez autocytowań=113 (wg *Web of Science* 31.07. 2018).

4.2 Wykaz autorskich publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)

Prace oryginalne:

- A1. **Kowalewicz-Kulbat M.**, Pestel J., Biet F., Loch C., Tonnel A-B., Druszczyńska M., Rudnicka W. „*Mycobacterium bovis* BCG Mycobacteria-New Application”. Polish Journal of Microbiology 2006;55(1):13-17

Udział habilitanta: 73%, współautor koncepcji pracy, przygotowanie planu eksperymentów, udział w wykonaniu większości części eksperymentalnej (izolacja komórek dendrytycznych pochodzenia monocytarnego oraz dziewiczych limfocytów T z krwi obwodowej, stymulacja antygenami, oznaczenie produkcji cytokin), opracowanie i interpretacja wyników, wykonanie analizy statystycznej, przygotowanie manuskryptu.

- A2. **Kowalewicz-Kulbat M.**, Kaźmierczak D., Donevski S., Biet F., Pestel J., Rudnicka W. „Naive helper T cells from BCG-vaccinated volunteers produce IFN-gamma and IL-5 to mycobacterial antigen-pulsed dendritic cells”. Folia Histochemica et Cytobiologica 2008; 46(2):153-157

Udział habilitanta: 80%, współautor koncepcji pracy, współudział w wykonaniu części eksperymentalnej (izolacja komórek dendrytycznych pochodzenia monocytarnego oraz dziewiczych limfocytów T i całej frakcji limfocytarnej z krwi obwodowej, stymulacja antygenami), opracowanie wyników, wykonanie analizy statystycznej uzyskanych wyników, przygotowanie manuskryptu.

- A3. Szpakowski P., Biet F., Loch C., Paszkiewicz M., Rudnicka W., Druszczyńska M., Allain F., Fol M. Pestel J., **Kowalewicz-Kulbat M.** “Dendritic cell activity driven by recombinant Mycobacterium bovis BCG producing human IL-18, in healthy BCG vaccinated adults”. Journal of Immunology Research *, 2015;2015:359153. doi: 10.1155/2015/359153

*Journal of Immunology Research (poprzednia nazwa czasopisma Clinical and Developmental Immunology)

Udział habilitanta: 56%, współautor koncepcji pracy, współudział w wykonaniu części eksperymentalnej (wykonanie immunoblotu potwierdzającego ekspresję IL-18 przez szczep rekombinowany Mycobacterium bovis BCG_{hIL-18}, współudział w wykonaniu analizy ekspresji receptorów powierzchniowych na komórkach dendrytycznych za pomocą cytometrii przepływowej, analiza ilościowa uwalnianych cytokin, część eksperymentalna związana z zastosowaniem przeciwciał neutralizujących), opracowanie i interpretacja analizy statystycznej uzyskanych wyników, przygotowanie manuskryptu, autor korespondencyjny

- A4. Druszczyńska M., **Kowalewicz-Kulbat M.**, Maszewska A., Rudnicka K., Szpakowski P., Wawrocki S., Włodarczyk M., Rudnicka W. „The balance between pro- and anti-inflammatory cytokines in the immune responses to BCG and DTwP vaccines. Acta Biochimica Polonica 2015;62:913-921.http://dx.doi.org/10.18388/abp.2015_1160 IF (2013):

Udział habilitanta: 40%, współautor koncepcji pracy, współudział w wykonaniu części eksperymentalnej (otrzymywanie komórek dendrytycznych, analiza ekspresji receptorów powierzchniowych za pomocą cytometrii przepływowej i interpretacja wyników, analiza ilościowa uwalnianych cytokin-IL-10 i IL-23 przez komórki dendrytyczne, założenie hodowli komórek dendrytycznych z limfocytami), analiza statystyczna uzyskanych wyników, współudział w przygotowaniu manuskryptu, pierwszy i drugi autor mają równy wkład w powstanie pracy

- A5. Fol M., Nitecka-Błażlak A., Szpakowski P., Madiraju M.VVS., Rudnicka W., Druszczyńska M., Pestel J., **Kowalewicz-Kulbat M.** „Evaluation of two different dendritic cell preparations to BCG reactivity”. Archives of Biological Sciences 2016;68,263-271

Udział habilitanta: 60%, współudział w koncepcji pracy, współudział w wykonaniu większości części eksperymentalnej (izolacja monocytów z krwi obwodowej za pomocą techniki separacji magnetycznej pozytywnej i negatywnej, hodowla komórek dendrytycznych, stymulacja antygenami, wykonanie dokumentacji fotograficznej obrazu mikroskopowego komórek dendrytycznych, współudział w przygotowaniu komórek do analizy cytometrycznej ekspresji receptorów powierzchniowych, analiza statystyczna uzyskanych wyników, współudział w opracowaniu graficznym otrzymanych danych i ich interpretacja, przygotowanie manuskryptu, autor korespondencyjny

- A6. **Kowalewicz-Kulbat M.**, Ograczyk E., Włodarczyk M., Krawczyk K., Fol M. “Efficiency and impact of positive and negative magnetic separation on monocyte derived dendritic cells generation”. Iranian Journal of Immunology 2016;13(2):132-140 doi: IJiv13i2A6.

Udział habilitanta: 67%, współudział w opracowaniu celu naukowego i koncepcji pracy, zaprojektowanie i wykonanie większości pracy eksperymentalnej (otrzymywanie komórek z krwi obwodowej metoda separacji pozytywnej i negatywnej, hodowla komórek dendrytycznych, znakowanie przeciwciałami monoklonalnymi w celu wykonania analizy cytometrycznej), analiza danych z cytometru przepływowego, analiza statystyczna, przygotowanie manuskryptu

- A7. **Kowalewicz-Kulbat M.**, Ograczyk E., Krawczyk K., Rudnicka W., Fol M. „Type of monocyte immunomagnetic separation affects the morphology of monocyte-derived dendritic cells, as investigated by scanning electron microscopy”. Journal of Immunological Methods 2016, 439: 79-82 doi: 10.1016/j.jim.2016.10.004.

Udział habilitanta: 45% współautor koncepcji pracy, współudział w wykonaniu części doświadczalnej (przygotowanie komórek dendrytycznych, stymulacja antygenami, analiza cytometryczna, mikroskopia skaningowa), analiza statystyczna uzyskanych wyników, współudział w opracowaniu zdjęć z mikroskopu skaningowego, opracowaniu graficznym otrzymanych danych i ich interpretacja, przygotowanie manuskryptu. Pierwszy autor i autor korespondencyjny mają równy wkład w powstanie pracy.

- A8. **Kowalewicz-Kulbat M.**, Szpakowski P., Loch C., Biet F., Kapłonek P., Krawczyk K.T., Pestel J., Rudnicka W. Tuberculin skin test reaction is related to memory, but not naive CD4⁺ T cell responses to mycobacterial stimuli in BCG-vaccinated young adults. Vaccine 2018 36(30):4566-4577. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.05.068

Udział habilitanta: 60% współautor koncepcji pracy, współudział w wykonaniu części doświadczalnej (przygotowanie komórek dendrytycznych, stymulacja antygenami, analiza cytometryczna, analiza statystyczna uzyskanych wyników, współudział w opracowaniu graficznym otrzymanych danych i ich interpretacja, przygotowanie manuskryptu. Pierwszy i korespondencyjny autor pracy.

Prace przeglądowe:

- A9. **Kowalewicz-Kulbat M.**, Loch C. BCG and protection against inflammatory and auto-immune diseases. Expert Review of Vaccines 2017;16(7):1-10. doi: 10.1080/14760584.2017.1333906.

Udział habilitanta: 70% współudział w opracowaniu celu i koncepcji artykułu, udział w dyskusji naukowej, bezpośredni udział w zbieraniu, analizie i wykorzystaniu danych źródłowych, przygotowanie manuskryptu.

- A10. Wawrocki S., Druszczyńska M, **Kowalewicz-Kulbat M***, Rudnicka W. „Interleukin 18 (IL-18) as a target for immune intervention. Acta Biochimica Polonica 2016;63(1):59-63.

Udział habilitanta: 30%, współudział w opracowaniu koncepcji artykułu, współudział w zbieraniu, analizie i wykorzystaniu danych źródłowych, przygotowanie manuskryptu, autor korespondencyjny.

Tabela 1 **Wskaźniki Impact Factor** (podano wartości IF dla czasopism zgodnie z rokiem opublikowania pracy, **punkty MNiSW** (podano wartości zgodnie z rokiem opublikowania oraz wg wykazu z dnia 9.12.2016) oraz **liczba cytowań** (na podstawie bazy *Web of Science* z dnia 31.07.2018r) **publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe**

Nr publikacji	IF zgodny z rokiem opublikowania	IF bieżący	IF 5-letni	Punkty MNiSW zgodne z rokiem opublikowania	Punkty MNiSW wg wykazu z dnia 09.12.2016	Indeks cytowań (WoS) z dnia 31.07.18
A1	-	0,746	0,938	10	15	-
A2	1,213	1,389	1,063	10	15	1
A3	2,812	3,276	2,833	25	30	4
A4	1,187	1,159	1,534	15	15	2
A5	0,352	0,352	0,487	15	15	1
A6	0,850	0,850	0,904	15	15	-
A7	2,100	2,100	2,094	20	20	1
A8	3,235	3,235	3,259	30	30	-
A9	3,555	3,555	3,638	35	30	-
A10	1,159	1,159	1,491	15	15	11
Suma	16,463	17,821	18,241	190	200	20

Oświadczenia wszystkich współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie poszczególnych prac znajdują się w Załączniku 5.

Finansowanie i współpraca:

Prowadzone przeze mnie prace naukowe, stanowiące monotematyczny cykl publikacji, finansowane były przez Komitet Badań Naukowych w ramach dwóch przyznanych projektów badawczych, w których pełniłam funkcję Kierownika (N N401 015236) lub głównego wykonawcy (2PO5A 156 28), a także jednego projektu wymiany dwustronnej polsko-francuskiej „Grant 6213.I/2005 w Programie Działań Zintegrowanych POLONIUM 2006”. Badania finansowane były także ze środków statutowych Katedry Immunologii i Biologii Infekcyjnej UŁ.

Charakter prowadzonych przeze mnie badań wymagał kontynuacji, nawiązanej w okresie wykonywania pracy doktorskiej, współpracy międzynarodowej (Instytut Pasteura w Lille, Francja), jak i krajowej (Międzywydziałowa Katedra Immunologii Klinicznej i Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi).

4.3 Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wprowadzenie do tematyki badań

Gruźlica (TB; tuberculosis) pozostaje jedną z najgroźniejszych chorób zakaźnych, umieszczanych obok AIDS i malarii na czele chorób infekcyjnych zagrażających zdrowiu człowieka. W 1882r Robert Koch podczas wykładu w Berlińskim Towarzystwie Fizjologicznym ogłosił, że prątki *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tb*) stanowią czynnik etiologiczny gruźlicy. 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 przybiera postać bezobjawową (latentną). Według danych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, ang. *World Health Organization*) [WHO TB report 2016] w 2016r z powodu gruźlicy na świecie zmarło 1,3 mln osób oraz dodatkowo 0,4mln osób z powodu koinfekcji wirusem HIV i zakażeniem *M. tuberculosis*. Ponadto odnotowano 10,4 mln nowych zachorowań, w tym milion dzieci do lat 14. [WHO TB report 2016]. Większość chorych stanowili mężczyźni-65%. Około 60% wszystkich chorych na gruźlicę to mieszkańcy Indii, Indonezji, Chin, Nigerii, Filipin, Pakistanu i Południowej Afryki.

W Polsce, według danych Krajowego Rejestru Zachorowań na Gruźlicę, prowadzonego przez Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie [Korzeniewska-Koseła 2017], w 2016r zapadalność na gruźlicę wszystkich postaci wynosiła 16,7 przypadków na 100 000 ludności, gruźlica płuc stanowiła 94,9% zachorowań, a średni wiek chorych wynosił 53,2 lat. Zagrożenie gruźlicą rośnie nie tylko z powodu narastającej częstości izolowania wielolekoopornych szczepów *M.tb*, braku nowych leków przeciwgruźliczych, koinfekcji prątków *M.tb* i wirusa HIV, braku prostych, szybkich testów diagnozowania zakażeń *M.tb*, ale także z powodu niewystarczającej efektywności protekcyjnej stosowanej u ludzi szczepionki BCG.

Szczepionka BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) została opracowana na początku XX wieku w Instytucie Pasteura w Lille we Francji przez Alberta Calmette i Camille Guérin, przez atenuację prątków gruźlicy bydlęcej *M. bovis*, którą osiągnięto po wykonaniu 231 pasaży w okresie 13 lat na podłożu hodowlanym z żółcią [Calmette A, 1909]. Przeciwgruźlicza szczepionka BCG została po raz pierwszy podana człowiekowi w 1921r, kiedy to zaszczepiono noworodka urodzonego przez chorą na gruźlicę matkę. Do dnia dzisiejszego jest to jedyna dopuszczona do powszechnego użycia szczepionka przeciwprątkowa, którą dotychczas podano ponad 4 bilionom dzieci w 182 państwach świata. Pierwotnie szczepionka podawana była doustnie, obecnie podawana jest głównie śródskórną. Do kalendarza szczepień obowiązkowych w Polsce szczepionka przeciw gruźlicy trafiła w latach 50 XX wieku. Niewątpliwą jej zaletą jest wysoka skuteczność w zapobieganiu najpoważniejszym formom gruźlicy u dzieci, zwłaszcza gruźlicy ośrodkowego układu nerwowego i uogólnionej gruźlicy zwanej

„prosówką”. Niestety, wywoływany przez prątki *M. bovis* BCG efekt protekcyjny jest niewystarczający [Kaufmann 2013, Rudnicka 2008], ulega znacznemu osłabieniu wraz z wiekiem i u osób dorosłych, poziom ochrony wykonywanych szczepień BCG waha się od 0-80% zależnie od regionu świata (Europa 60-80%, Indie i Pakistan 0%), w Polsce wynosi najwyżej 50% [Załącznik 3b Publikacja C6].

Przyczyn zróżnicowanej skuteczności szczepień jest kilka, wśród nich istotną rolę odgrywają czynniki środowiskowe, genetyczne, kulturowe, a także technika przeprowadzania immunizacji. Jednym z czynników zmniejszających skuteczność immunizacji może być nasilona ekspozycja organizmu na niechorobotwórcze prątki środowiskowe, prowadząca do zahamowania namnażania się prątków szczepionkowych i ich przyspieszonej eradykacji z organizmu na drodze reakcji krzyżowej (Demangel i wsp. 2005). W wielu krajach na świecie atenuowany szczep *M. bovis* BCG namnażano do produkcji szczepionek co doprowadziło do powstania kilkunastu szczepów siostrzanych różniących się lokalizacją i liczbą mutacji w genomowym DNA, a także poziomem ekspresji niektórych genów [Mostowy i wsp. 2003]. Stworzenie nowej, bardziej efektywnej szczepionki przeciwprątkowej, stało się jednym z zamierzeń programu walki z gruźlicą ogłoszonego przez WHO, który to program zakłada zmniejszenie na świecie do 2035 roku o 95% liczby zgonów z powodu gruźlicy i o 90% średniej zapadalności na gruźlicę. W wielu ośrodkach badawczych na świecie, w różnych modelach eksperymentalnych podejmowane są liczne próby stworzenia takiego preparatu, który doprowadzi do efektywniejszego nabycia odporności przeciw prątkom gruźlicy [Hewinson 2005, Cardona i Williams 2017, Voss i wsp. 2018]. Pogłębienie wiedzy o mechanizmach odporności przeciwgruźliczej jest niezbędne dla opracowania nowych szczepionek lub sposobów zwiększenia skuteczności dotychczas stosowanych szczepów *M. bovis* BCG. Postuluje się, iż walka z gruźlicą wymaga opracowania szczepionek pobudzających skuteczną odporność przeciwgruźliczą u niemowląt i noworodków, szczepionek typu booster pozwalających na wzmocnienie odporności wykazującej tendencje do zanikania wraz z wiekiem, czy wreszcie szczepionek, które zastosowane w trakcie aktywnej gruźlicy nasilałyby naturalne mechanizmy odporności komórkowej wspomagając tym samym eliminację patogenu. Wśród nich znaleźć można szczepionki wykorzystujące atenuowane mykobakterie, rekombinowane białka prątków, szczepionki DNA oraz szczepionki wykorzystujące nośniki wirusowe [Global Tuberculosis Report 2017, Voss i wsp. 2018], jednak zdaniem WHO prawdopodobnie żaden z obecnie testowanych 13 nowych preparatów szczepionkowych w różnych fazach badań klinicznych, [Voss i wsp. 2018] w najbliższej przyszłości nie zastąpi obecnie stosowanej szczepionki BCG.

Istotnym elementem układu odpornościowego, który w szczególny sposób zasługuje na uwzględnienie w pogłębianiu wiedzy o mechanizmach odporności przeciwgruźliczej i wykorzystaniu tej wiedzy do opracowania nowych szczepionek uodporniających na chorobotwórcze działanie prątków gruźlicy jest komórka dendrytyczna (KD), odkryta przez Ralpha Steinmana w 1973 roku (Nagroda Nobla 2011) [Rudnicka i wsp. 2012], cechująca się unikatową funkcją prezentowania

antygenów limfocytom T, w tym dziewiczym limfocytom T. Komunikacja prezentującej antygeny komórki dendrytycznej z limfocytom zachodzi w obrębie dynamicznej struktury zwanej synapsą immunologiczną. Po raz pierwszy termin synapsa immunologiczna zastosował M.A. Norcross w 1984r, a w 1998r Kupfer, jako pierwszy pokazał, iż białka powierzchni kontaktowej pomiędzy limfocytami a komórką prezentującą antygen ulegają selekcyjnemu przemieszczeniu. W trakcie formowania synapsy następuje szereg zmian kształtu komórki, reorganizacji organelli komórkowych oraz istotna rearanżacja białek w błonie plazmatycznej w obszarze kontaktu. O ile dynamika powierzchni komórek T i białek sygnałowych w przestrzeni synaptycznej jest dość dobrze znana, o tyle znacznie mniej wiadomo o zmianach zachodzących wewnątrz komórki, zwłaszcza podczas tworzenia synapsy między APC a limfocytami o fenotypie CD4⁺ [Huppa i wsp. 2003]. Główną funkcją synapsy immunologicznej jest zapewnienie ukierunkowanego przekazu cytokin i cząsteczek sygnałowych. Kluczowym momentem w inicjacji adaptacyjnej odpowiedzi immunologicznej jest aktywacja limfocytów T, w której udział biorą trzy sygnały. Formowanie I sygnału jest związane z rozpoznaniem prezentowanego przez komórki dendrytyczne, w kontekście cząsteczek MHC, immunopeptydu przez receptor TCR limfocyta. To swoiste rozpoznanie kompleksu MHC-immunopeptyd przez TCR stanowi konieczny, ale niewystarczający sygnał aktywacji limfocyta. Potrzebne jest dostarczenie dodatkowego II sygnału przez ligację receptorów kostymulujących, takich jak CD86, CD80, dla których ligandem jest cząsteczka CD28 na limfocycie. O ile samo powstawanie sygnału aktywacji limfocyta zależy od typu antygeny rozpoznawanego i prezentowanego w kontekście cząsteczek MHC przez TCR, to siła tego sygnału i jego specyfika zależą od profilu ekspresji receptorów kostymulujących. Ponadto, charakter tego sygnału jest silnie determinowany przez mikrośrodowisko cytokinowe, wydzielane przez kontaktujące się ze sobą komórki, co stanowi III sygnał aktywacji.

Zrozumienie procesów zachodzących, w formowanej w odpowiedzi na prątki *Mycobacterium bovis* BCG, synapsie immunologicznej jest niezbędne dla poznania i wyjaśnienia mechanizmów odpowiedzialnych za obserwowany brak odpowiedzi na szczepionkę BCG wytworzeniem nadwrażliwości późnej w grupie zdrowych, młodych osób szczepionych w dzieciństwie szczepionką BCG. Jednocześnie, rozwój wiedzy w tym zakresie może stanowić istotny element w konstruowaniu nowej i bardziej skutecznej szczepionki, opartej na celowej ingerencji w procesy przetwarzania i prezentacji antygenów prątkowych i pobudzania długotrwałej swoistej odporności typu komórkowego.

Cele/zadania badawcze

Problematyka badań prowadzonych przeze mnie w ramach przedłożonego do oceny osiągnięcia naukowego koncentruje się wokół wyjaśnienia procesów komórkowych zachodzących w synapsie immunologicznej formowanej przez ludzkie komórki dendrytyczne z limfocytami T, w odpowiedzi na antygeny prątków szczepionkowych *M. bovis* BCG, z

uwzględnieniem roli IL-18, jako modulatora w badanych reakcjach odpornościowych, a także sposobu izolacji komórek dendrytycznych determinującego ich właściwości fenotypowe i sekrecyjne.

Przesłanką do podjęcia takich badań był niezadowolający efekt protekcyjny przeciwgruźliczej szczepionki BCG, rosnące zainteresowanie szczepami *M. bovis* BCG, jako modulatorami odpowiedzi odpornościowej, ale także udokumentowany brak wiedzy w zakresie zrozumienia przyczyny braku odpowiedzi u niektórych młodych, zdrowych osób na stosowaną w dzieciństwie szczepionkę BCG, manifestującą się brakiem wytworzenia nadwrażliwości typu późnego na tuberkulinę. Zatem próba głębszego poznania procesów zachodzących w centralnym miejscu styku komórek dendrytycznych i limfocytów, jak również podjęta próba zwiększenia immunogenności szczepu BCG poprzez wprowadzenie rekombinowanego szczepu rBCG z ekspresją ludzkiej IL-18 (rBCGhIL-18) jako nowego modulatora odpowiedzi odpornościowej jest w pełni uzasadniona i ważna, pod względem poznawczym. Ponadto, po raz pierwszy dokonano próby weryfikacji oryginalnej hipotezy dotyczącej potencjalnego wpływu sposobu uzyskiwania komórek dendrytycznych na ich właściwości i funkcjonowanie w synapsie immunologicznej co wydaje się być szczególnie istotne z punktu widzenia zastosowania tych komórek w przyszłości jako narzędzia do walki z chorobami zakaźnymi, w tym gruźlicą.

Podjęty cel główny obejmował realizację następujących celów pośrednich:

Cel 1

Identyfikowanie receptorowych i funkcjonalnych wyznaczników procesów komórkowych zachodzących w synapsie immunologicznej formowanej przez ludzkie komórki dendrytyczne z limfocytami T, inicjowanych przez atenuowane prątki BCG i PPD.

Cel 2

Charakterystyka fenotypu komórki dendrytycznej i funkcjonalnych efektów synapsy immunologicznej formowanej przez ludzkie komórki dendrytyczne z dziewiczymi i pamięciowymi limfocytami CD4⁺ w odpowiedzi na BCG i PPD oraz próba ich modyfikacji w środowisku IL-18 produkowanej przez rekombinowany szczep rBCGhIL-18.

Cel 3

Porównanie morfologii, fenotypu receptorowego i aktywności sekrecyjnej komórek dendrytycznych uzyskiwanych z ludzkiej krwi obwodowej metodą pozytywnej i negatywnej separacji magnetycznej, jako cech potencjalnie istotnych dla aplikacyjnych zastosowań tych komórek

Badaniami objęto odpowiednio dobraną populację złożoną z osób młodych, zdrowych, szczepionych w dzieciństwie szczepionką BCG, u których wykonano skórny test tuberkulinowy będący miarą wytworzonej nadwrażliwości później na tuberkulinę. Od osób badanych izolowano monocyty, które następnie w warunkach *in vitro* przekształcano w komórki dendrytyczne oraz autologiczne limfocyty, z których izolowano subpopulację limfocytów dziewiczych i pamięci. Trzon osiągnięcia naukowego stanowi 8 prac doświadczalnych oraz 2 prace przeglądowe, dostarczające nowatorskich danych o mechanizmie złożonych reakcji odpornościowych inicjowanych przez szczepionkowe prątki *M. bovis* BCG z odniesieniem do ich aktywności *in vivo* oraz możliwości modyfikowania interakcji tych mykobakterii z komórkami dendrytycznymi i limfocytami przez ludzką IL-18.

OPIS OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

Cel 1 Identyfikowanie receptorowych i funkcjonalnych wyznaczników procesów komórkowych zachodzących w synapsie immunologicznej formowanej przez ludzkie komórki dendrytyczne z limfocytami T, inicjowanych przez atenuowane prątki BCG i PPD.

A1 Kowalewicz-Kulbat M., Pestel J., Biet F., Loch C., Tonnel A-B., Druszczyńska M., Rudnicka W. „*Mycobacterium bovis* BCG Mycobacteria-New Application. Polish Journal of Microbiology 2006,55(1):13-17

A2 Kowalewicz-Kulbat M., Kaźmierczak D., Donevski S., Biet F., Pestel J., Rudnicka W. „Naive helper T cells from BCG-vaccinated volunteers produce IFN-gamma and IL-5 to mycobacterial antigen-pulsed dendritic cells”. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 2008; 46(2):153-157 doi: 10.2478/v10042-008-0023-6

A4 Druszczyńska M., Kowalewicz-Kulbat M., Maszewska A., Rudnicka K., Szpakowski P., Wawrocki S., Włodarczyk M., Rudnicka W. „The balance between pro- and anti-inflammatory cytokines in the immune responses to BCG and DTwP vaccines. *Acta Biochimica Polonica* 2015;62:913-921.http://dx.doi.org/10.18388/abp.2015_1160 IF (2013):

A8 Kowalewicz-Kulbat M, Loch C. BCG and protection against inflammatory and auto-immune diseases. *Expert Review of Vaccines* 2017;16(7):1-10 doi: 10.1080/14760584.2017.1333906.

Identyfikacja komórki dendrytycznej jako ogniwa pośredniczącego pomiędzy elementami odporności nieswoistej i swoistej otworzyła nowe możliwości szczegółowego badania procesów odpornościowych i wykorzystania nowych odkryć do walki z chorobami zakaźnymi. Wraz z postępem wiedzy rozszerza się zakres funkcji, jaką pełnią komórki dendrytyczne na wszystkich etapach reakcji odpornościowej. Unikatowa zdolność tych komórek do prezentowania antygenów dziewiczym

limfocytom T czyni je niezbędnymi w rozwoju swoistej odpowiedzi komórkowej, w której limfocyty T pełnią funkcję efektorową. Jednak komórki dendrytyczne są nie tylko profesjonalnymi komórkami prezentującymi antygen, ale pierwszymi komórkami wykrywającymi sygnały alarmowe w tkankach, których pojawienie się stanowi efekt wnikających drobnoustrojów. W wyniku kontaktu z antygenem dochodzi to intensywnych zmian kształtu i mobilności komórek dendrytycznych, która z formy niedojrzałej przyjmuje postać dojrzałą ułatwiającą częste kontakty z limfocytami [Mempel i wsp. 2004]

Interakcja komórek dendrytycznych, zwłaszcza komórek dendrytycznych pochodzenia monocytarnego, z prątkami *Mycobacterium bovis* BCG przebiega wieloetapowo i odgrywa kluczową rolę w odporności przeciwprątkowej [Załącznik 3a Publikacja C10, Humpreys i wsp. 2006]. Rodzaj inicjowanej przez prątki BCG odpowiedzi odpornościowej ustala się podczas prezentacji antygeny przez KD i zależy od stopnia jej dojrzenia, stanu funkcjonalnego, fenotypu komórki dendrytycznej w synapsie immunologicznej oraz produkowanych cytokin, które determinują proliferację i różnicowanie się rozpoznających antygeny limfocytów. Niezwykle silne właściwości prątków *M. bovis* BCG do wzbudzania odpowiedzi odpornościowej typu Th1 sprawiły, iż aktywność tych bakterii jest doceniana nie tylko w kontekście ochrony przed gruźlicą, ale także innych chorób o podłożu infekcyjnym, a także pewnych chorób nowotworowych i autoimmunologicznych [Publikacja A9]. Jednak wciąż pozostaje niejasne, czy prątki BCG są wystarczająco silnym stymulatorem zdolnym do wzbudzenia odpowiedzi Th1 u osób z silnie przesuniętą równowagą odpowiedzi odpornościowej w stronę Th2, do których należą osoby z alergią. Czy tym samym można się spodziewać, że komórki odpornościowe osób wykazujących stan nadwrażliwości wczesnej na alergen, świadczący o preferencyjnym rozwijaniu alergeno-specyficznej odpowiedzi o profilu Th2, będą zdolne do prawidłowej odpowiedzi na prątki *M. bovis* BCG stanowiące szczepionkę przeciwgruźliczą? Analizując powyższe zagadnienie **postawiono hipotezę, że prątki *M. bovis* BCG pomimo niesprzyjającego środowisku Th2, w warunkach stymulacji alergenem, nadal wykazują właściwości promowania silnej odpowiedzi typu Th1.** W badaniach sprawdzono zdolność prątków *M. bovis* BCG prezentowanych przez KD do wzbudzania silnej produkcji IFN- γ przez limfocyty dziewicze nawet wówczas kiedy w środowisku występował silny alergen [Publikacja A1]. Dzięki nawiązanej w okresie realizacji pracy doktorskiej współpracy z Katedrą Immunologii, Mikrobiologii i Astmy Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, udało mi się jako model do tych badań uzyskać komórki dendrytyczne i limfocyty dziewicze osób chorych z astmą alergiczną, uczulonych na alergen kurzu domowego Der p 1 (*Dermatophagoides pteronyssinus*). Grupę odniesienia stanowiły osoby zdrowe młode, które nigdy nie chorowały na gruźlicę i u których wykluczono podłoże alergiczne. Obie grupy badane w dzieciństwie szczepione były szczepionką BCG.

Analiza mająca na celu ocenę produkcji IFN- γ przez limfocyty dziewicze osób zdrowych i chorych z astmą uczulonych na alergen kurzu domowego Der p 1 wykazała, iż ludzkie KD inokulowane żywymi prątkami *M. bovis* BCG, w środowisku alergenu, w warunkach *in vitro* zdolne były do wzbudzania

silnej odpowiedzi Th1 manifestującej się produkcją IFN- γ przez limfocyty dziewicze zarówno w grupie osób zdrowych, jak i chorych. Ponadto, prątki *M. bovis* BCG pełniły funkcję modulatora osłabiającego niekorzystną pro-alergiczną odpowiedź typu Th2 (spadek produkcji cytokin IL-4 i IL-5) w stronę anty-alergicznego profilu Th1. Dokładna analiza wyników uwidoczniła kluczową rolę prątków szczepionkowych *M. bovis* BCG jako silnego stymulatora odpowiedzi typu Th1 nawet w warunkach toczącej się reakcji zapalnej, u której podstaw leży odpowiedź Th2. Otrzymane wyniki pozwoliły na wysunięcie wniosku, iż prątki BCG, których immunomodulacyjne właściwości są stosowane w klinice w leczeniu raka pęcherza [Herr i Dalbagni 2003] mogłyby stanowić ważny element nowej strategii terapeutycznej wykorzystywanej w przyszłości w leczeniu chorób alergicznych. Próby immunomodulacji reakcji alergicznej za pomocą komórek dendrytycznych i prątków *Mycobacterium* zostały szerzej opisane w pracy przeglądowej [Załącznik 3a Publikacja C8].

Udowodnione silne właściwości immunogenne i immunomodulatorowe prątków BCG skłoniły mnie do sprawdzenia w kolejnej pracy [Publikacja A2], czy oprócz prątków, również oczyszczone białko tuberkulinowe (purified protein derivative PPD) prezentowane przez komórki dendrytyczne zdolne będzie do wzbudzania silnej odpowiedzi Th1. Postanowiłam także sprawdzić, czy odpowiedź cytokinowa, na antygen PPD i prątki BCG prezentowane przez KD, będzie silniejsza, czy słabsza w przypadku pobudzenia całej frakcji limfocytarnej w odniesieniu do limfocytów dziewiczych. Grupę badaną stanowiły młode, zdrowe osoby, szczepione w dzieciństwie szczepionką BCG. Przeprowadzone badania wykazały, iż już w pierwszej dobie ko-hodowli limfocytów z prezentującymi PPD komórkami dendrytycznymi, limfocyty dziewicze 91% ochotników i komórki pełnej frakcji limfocytarnej wszystkich osób badanych odpowiedziały na antygen produkcją IFN- γ . Zaobserwowana, w odpowiedzi na antygen PPD prezentowany przez KD, istotnie niższa produkcja IFN- γ przez limfocyty dziewicze w porównaniu do pełnej frakcji limfocytarnej sugerowała, oprócz limfocytów dziewiczych udział innych komórek, takich jak: limfocyty pamięci, komórki NK, limfocyty γ/δ w produkcji IFN- γ . Z kolei obserwowany, w odpowiedzi na prątki *M. bovis* BCG prezentowane przez KD, brak istotnych różnic w intensywności produkcji IFN- γ pomiędzy limfocytami dziewiczymi i pełną frakcją limfocytarną wskazuje na kluczowy udział limfocytów dziewiczych w produkcji tej cytokiny. Zaobserwowana w badaniach wcześniejszych [Publikacja A1] zdolność prątków BCG do pobudzania limfocytów dziewiczych osób zdrowych, szczepionych w dzieciństwie szczepionką BCG, do produkcji Th2-zależnej IL-5 skłoniła mnie do sprawdzenia, czy oczyszczone białko tuberkulinowe PPD prezentowane przez KD będzie w stanie wzbudzić, podobnie jak prątki BCG, produkcję IL-5 przez limfocyty dziewicze i jeśli tak, to czy ilość produkowanej cytokiny będzie porównywalna z ilością uwalnianą przez pełną frakcję limfocytarną. Interleukina 5, jako cytokina antagonistyczna w stosunku do IFN- γ może ograć istotną rolę w odmiennej reaktywności na oczyszczone białko tuberkulinowe u osób z dodatnim i ujemnym odczynem tuberkulinowym. Biorąc pod uwagę fakt, iż limfocyty poddane działaniu KD niestymulowanych nie

produkowały IL-5, można uznać, że obserwowany poziom cytokiny w hodowlach komórkowych odzwierciedlał reakcję antygenowo-swoistą. Zaobserwowano, iż produkcja IL-5, zarówno w hodowlach dziewiczych limfocytów T, jak i pełnej, nierozdzielanej frakcji limfocytarnej, kształtowała się na zbliżonym poziomie w wyniku stymulacji komórek dendrytycznych PPD i BCG. Analiza porównawcza komórek stymulowanych PPD względem komórek poddanych działaniu prątków BCG, wykazała, iż antygen PPD istotnie silniej nasilał produkcję IL-5, niż prątki BCG zarówno w hodowlach limfocytów dziewiczych, jak i nierozdzielanej frakcji limfocytarnej. Uzyskane wyniki z tej części pracy wskazują, iż limfocyty dziewicze o fenotypie $CD4^+CD45RA^+$ izolowane od osób szczepionych BCG przyjmują postać limfocytów efektorowych zdolnych do produkcji zarówno IFN- γ , jak i IL-5, po stymulacji KD prezentującymi mykobakteriowe białka zawarte w PPD lub zakażane prątkami *M. bovis* BCG. Kinetyka i intensywność pobudzonej przez komórki dendrytyczne odpowiedzi Th1 i Th2 ściśle zależy od prezentowanego antygeny. Uzyskane rezultaty pozwoliły na wysunięcie wniosku, iż właściwa równowaga odpowiedzi Th1/Th2 stanowi kluczowy czynnik w monitorowaniu odpowiedzi komórkowej na zakażenia *Mycobacterium*.

Mając na uwadze powyższe spostrzeżenia, w kolejnej pracy [Publikacja A4] przeprowadziłam badania zmierzające do sprawdzenia zależności pomiędzy uwalnianiem cytokin pro- i przeciwzapalnych wydzielanych przez komórki prezentujące antygen oraz limfocyty w hodowlach komórkowych stymulowanych prątkami *M. bovis* BCG. Ponadto, zróżnicowana odpowiedź na podanie tuberkuliny PPD w testach tuberkulinowych [Załącznik 3a Publikacja C6] u młodych, zdrowych osób szczepionych w dzieciństwie szczepionką BCG skłoniła mnie do sprawdzenia, czy brak równowagi w produkcji cytokin Th1/Th2 może tłumaczyć brak wytworzenia nadwrażliwości później na tuberkulinę (*Delayed Type Hypersensitivity-DTH*) oceniany *in vivo*. W literaturze brak było doniesień poświęconych analizie mechanizmów komórkowych leżących u podstaw braku rozwoju DTH na tuberkulinę u dużego odsetka osób młodych otrzymujących wielokrotnie szczepionkę BCG, a koncentrujących się na zjawiskach zachodzących w synapsie immunologicznej pomiędzy komórką prezentującą antygen a limfocytom.

Badania, których wyniki opisano w **Publikacji A4** przeprowadzono z udziałem dużej grupy osób młodych (118 osób), zdrowych, szczepionych w dzieciństwie szczepionką BCG, u których wykonano skórny test tuberkulinowy przed pobraniem krwi. Skórny test tuberkulinowy (tuberculin skin test, TST) jest jedną z najstarszych i wciąż powszechnie używanych metod w diagnostyce gruźlicy i stanowi miernik rozwoju swoistej odporności komórkowej na tuberkulinę (PPD; ang. Purified Protein Derivative) określanej mianem nadwrażliwości późnej (DTH). Test ten opiera się na śródskórnym wstrzyknięciu w środkową część przedramienia zazwyczaj 2 jednostek tuberkuliny (2IU International Unit) PPD RT23. Po czasie 48-72h ocenia się średnicę stwardnienia powstałego na skutek rozwoju DTH. Immunologiczne podłoże tej reakcji związane jest z napływem limfocytów T i B oraz monocytów, makrofagów do miejsca iniekcji oraz produkcją przez „uczulone” komórki mediatorów reakcji zapalnej (IL-8, IFN- γ , TNF- α) [Załącznik 3a Publikacja B20]. W populacji

polskiej, szczepionej BCG, za wynik dodatni przyjmuje się naciek nie mniejszy niż 10mm. Test tuberkulinowy nie odzwierciedla stanu odporności na gruźlicę, ale jest dowodem na rozwój swoistej odporności komórkowej na produkty mykobakterii, do której dochodzi u większości osób szczepionych BCG. Ponadto, test ten jest jedynym obecnie stosowanym, który pozwala badać reakcje na antygeny mykobakterii w warunkach *in vivo*. Wyniki badań prowadzonych przez wiele lat w Zakładzie Immunologii Komórkowej UŁ wskazały, iż osoby zdrowe, młode w wieku 18-30 lat, poddawane szczepieniom BCG w dzieciństwie zgodnie z obowiązującym kalendarzem szczepień w Polsce, różnią się istotnie odpowiedzią na tuberkulinę i jedynie 50-60% spośród nich wykazuje odczyn dodatni testu tuberkulinowego, pozostali są tuberkulinoujemni [Załącznik 3a Publikacja C6, Publikacja B13]. To wysokie zróżnicowanie osobnicze skłoniło do postawienia hipotezy, że zjawisko polaryzacji odpowiedzi immunologicznej w kierunku Th1/Th2 może wpływać na obserwowany brak DTH na tuberkulinę. Analiza produkcji IFN- γ przez stymulowane PPD limfocyty obwodowe osób tuberkulino dodatnich TST(+) i tuberkulino ujemnych TST(-) wykazała, iż cytokina ta była istotnie częściej i intensywniej produkowana przez limfocyty osób z dodatnim, niż z ujemnym odczynem tuberkulinowym. Ponadto zaobserwowano pozytywną korelację pomiędzy średnicą odczynu tuberkulinowego a intensywnością produkcji IFN- γ przez limfocyty obwodowe w warunkach *in vitro*. Przyczyną słabszej produkcji IFN- γ przez limfocyty osób TST(-) mogła być nasilona produkcja interleukiny 10 (IL-10), która jest cytokiną hamującą wydzielanie IFN- γ . Wykazano, iż limfocyty osób TST(-) produkowały w odpowiedzi na PPD istotnie intensywniej IL-10, w porównaniu do limfocytów osób TST(+). Stwierdzono także odwrotną korelację pomiędzy średnicą odczynu tuberkulinowego a produkcją IL-10 przez stymulowane PPD limfocyty obwodowe. Uzyskane wyniki badań oraz dane literaturowe wskazujące, iż IL-10 może osłabiać aktywność komórek dendrytycznych poprzez obniżanie ekspresji cząsteczek zaangażowanych w przekazywanie sygnałów w synapsie immunologicznej [Rizzuti i wsp. 2015] skłoniły mnie do rozszerzenia badań o analizę ekspresji cząsteczek powierzchniowych (HLA-DR, CD86 i CD80) oraz produkcję cytokin IL-12, IL-23 i IL-10 przez stymulowane PPD i BCG komórki dendrytyczne osób młodych, szczepionych w dzieciństwie szczepionką BCG, z ujemnym i dodatnim odczynem tuberkulinowym. Wyniki analiz wskazały, iż komórki dendrytyczne osób TST(-) w odpowiedzi na stymulację PPD charakteryzowały się obniżoną zdolnością ekspresji antygenów MHC klasy II (HLA-DR) i cząsteczki kostymulującej CD86 (I i II sygnał aktywacji w synapsie immunologicznej) w porównaniu do komórek dendrytycznych osób TST(+). Wiadomo, iż niska ekspresja receptorów powierzchniowych KD jest istotnie związana z niedojrzałością KD, a tym samym osłabioną prezentacją antygeny limfocytom T [Steinman 2008]. Zjawisku temu towarzyszyła nasilona produkcja IL-10 przez stymulowane PPD limfocyty osób TST(-). **Przeprowadzone badania pozwoliły konkludować, iż u podstaw braku DTH na tuberkulinę u osób tuberkulinoujemnych leży osłabiona siła I i II sygnału w synapsie immunologicznej oraz silna polaryzacja odpowiedzi Th2 będąca konsekwencją nasilonej produkcji IL-10 wydzielanej**

przez komórki dendrytyczne stymulowane antygenami *Mycobacterium*, której towarzyszyła istotnie osłabiona produkcja IFN- γ przez limfocyty obwodowe. A zatem IFN- γ wydzielany przez limfocyty (zwłaszcza o fenotypie CD4⁺) [Publikacja A4] wydaje się być markerem nadwrażliwości typu późnego indukowanej przez prątki *M. bovis* BCG. Postawiona hipoteza o kluczowym znaczeniu polaryzacji Th1/Th2 w rozwoju DTH na tuberkulinę została pozytywnie zweryfikowana.

Dalsze badania procesów zachodzących na etapie prezentacji antygeny i odpowiedzi limfocytów na szczepionkę BCG, rozszerzono o analizę dodatkowych receptorów powierzchniowych na powierzchni komórek dendrytycznych oraz uwzględnienie w badaniach odpowiedzi limfocytów dziewiczych i pamięci. Wyniki tych analiz zostały zaprezentowane w pracach diskutowanych w kolejnym rozdziale [Publikacja A3 i A8].

Za najważniejsze wyniki badań przeprowadzonych w ramach I cyklu prezentowanej rozprawy habilitacyjnej należy uznać:

1. wykazanie, iż komórki dendrytyczne stymulowane BCG zachowują zdolność pobudzania silnej odpowiedzi Th1 nawet w środowisku silnej polaryzacji odpowiedzi komórkowej typu Th2.
2. spostrzeżenie, iż limfocyty dziewicze o fenotypie CD4⁺, izolowane od osób szczepionych BCG, w odpowiedzi na prezentowane przez KD rozpuszczalne białka tuberkulinowe (PPD) lub antygeny żywych prątków *M. bovis* BCG, przyjmują postać limfocytów efektorowych zdolnych do zrównoważonej produkcji cytokin Th1 (IFN- γ), jak i Th2 (IL-5). To potwierdza użyteczność przyjętego modelu badawczego w monitorowaniu adaptacyjnej odpowiedzi komórkowej na atenuowane prątki *M. bovis* BCG.
3. zaobserwowanie, iż oceniana *in vivo* areaktywność na PPD u szczepionych BCG osób TT(-) pozostaje w relacji z ułomną zdolnością KD stymulowanych PPD *in vitro*, do zwiększania ekspresji sygnałowych receptorów synapsy immunologicznej, jakimi są cząsteczki HLA-DR, przy jednoczesnej nadprodukcji IL-10 i zredukowanej funkcji pobudzania produkcji IFN- γ przez komórki limfoidalne.

Cel 2

Charakterystyka fenotypu komórki dendrytycznej i funkcjonalnych efektów synapsy immunologicznej formowanej przez ludzkie komórki dendrytyczne z dziewiczymi i pamięciowymi limfocytami CD4⁺ w odpowiedzi na BCG i PPD oraz próba ich modyfikacji w środowisku IL-18 produkowanej przez rekombinowany szczep rBCGhIL-18.

A3 Szpakowski P., Biet F., Loch C., Paszkiewicz M., Rudnicka W., Druszczyńska M., Allain F., Fol M., Pestel J., **Kowalewicz-Kulbat M.** “Dendritic cell activity driven by recombinant Mycobacterium bovis BCG producing human IL-18, in healthy BCG vaccinated adults”. Journal of Immunology Research, 2015;2015:359153. doi: 10.1155/2015/359153

A8 **Kowalewicz-Kulbat M.**, Szpakowski P., Loch C., Biet F., Kaplonek P., Krawczyk K.T., Pestel J., Rudnicka W. Tuberculin skin test reaction is related to memory, but not naive CD4⁺ T cell responses to mycobacterial stimuli in BCG-vaccinated young adults. Vaccine 2018;36:4566-4577 doi: 10.1016/j.vaccine.2018.05.068

A10 Wawrocki S., Druszczyńska M, **Kowalewicz-Kulbat M***, Rudnicka W. „Interleukin 18 (IL-18) as a target for immune intervention. Acta Biochimica Polonica 2016;63(1):59-63. doi: 10.18388/abp.2015_1153.

Zdolność do promowania określonego kierunku odpowiedzi limfocytów nie wynika jak dawniej zakładano z „zaprogramowanego z góry” stanu funkcjonalnego komórki, ale jest efektem zróżnicowanego dojrzewania KD, w którym to procesie istotną rolę odgrywa zarówno ekspresja receptorów synapsy immunologicznej, ale także obecność czynników endogennych (cytokiny, hormony) lub egzogennych (obecność drobnoustrojów) wzbudzających w KD predyspozycje efektorowe i kierujące różnicowaniem limfocytów T [Steinman 2008]. Fenotyp komórki dendrytycznej w synapsie immunologicznej określony na podstawie profilu ekspresji receptorów stanowiących II sygnał aktywacji oraz produkowane cytokiny, determinują kierunek polaryzacji odpowiedzi limfocytów T na antygen. Pomimo ogromnego postępu wiedzy w zakresie charakterystyki uwalnianych cytokin przez komórki Th1, Th2, Th17, Treg, wewnątrzkomórkowych sygnałów biorących udział w tym procesie, zjawisko polaryzacji limfocytów wciąż kryje wiele tajemnic. Reakcja między kompleksem Ag-MHC na KD a receptorem TCR na limfocytach T zapoczątkowuje etap tworzenia synapsy immunologicznej obejmujący polaryzację limfocyta T, adhezję limfocyta T i KD oraz etap dojrzewania synapsy. Jak wskazują badania, limfocyt T wykazuje zagęszczenie receptorów TCR na powierzchni kontaktu z KD i w obu komórkach dochodzi do wzrostu ekspresji cząsteczek adhezyjnych, których oddziaływanie stabilizują układ MHC-Ag-TCR oraz białek odpowiedzialnych za przekazywanie sygnałów do jądra komórki. Transdukcja pierwszego sygnału aktywacji do wnętrza dziewiczego limfocyta T powoduje syntezę niewielkich ilości IL-2. W przypadku braku drugiego sygnału aktywacji limfocyt przechodzi w stan anergii, co wiąże się z utratą zdolności dalszego

różnicowania. Jeśli jednak drugi sygnał aktywacji jest obecny, to limfocyt T powiększa swoje rozmiary, proliferuje, uwalnia cytokiny (IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ , TNF, GM-CSF) oraz zwiększa ekspresję CD40L. Wiązanie CD80 i CD86 z CD28 powoduje w limfocytach T stabilizację mRNA dla IL-2 i innych cytokin, co przedłuża dostarczanie sygnałów aktywacji. Ponadto, kostymulacja drogą CD28 wzmacnia ekspresję genu dla Bcl-x_L, który chroni limfocyty T przed indukowaną przez Fas (CD95) apoptozą i wpływa na ich przeżycie. Podczas procesu aktywacji limfocyt T wchodzi w interakcję z komórką prezentującą antygen przez produkowane cytokiny lub przez kontakt bezpośredni, np. przez oddziaływanie cząsteczki CD40L z CD40 na KD, które zwiększa ekspresję antygenów MHC, cząsteczek kostymulujących na KD i wzmacnia sekrecję cytokin przez KD (IL-1, TNF, IL-12), a także ekspresję cząsteczki OX40L na KD, przez którą zostaje przekazany sygnał dziewiczym limfocytom T do wytwarzania IL-4. Dopełnieniem bezpośredniej prezentacji antygenów limfocytom T przez KD jest oddziaływanie na nie przez produkowane cytokiny, promujące dalszy rozwój limfocytów dziewiczych T do funkcjonalnych limfocytów Th1, Th2, Th17 i Treg. Udowodniono istotną rolę IL-12 i IL-23 w promowaniu odpowiedzi Th1, podczas gdy IL-4 silnie promuje rozwój odpowiedzi Th2, IL-10 limfocytów Treg a IL-17 limfocytów Th17. Część limfocytów stymulowanych antygenem przekształca się w komórki pamięci.

Limfocyty T pamięci stanowią heterogenną grupę komórek o fenotypie CD45RO⁺CD45RA⁻ [Farber i wsp. 2014]. Ze względu na obecność poszczególnych receptorów, zdolność do produkcji cytokin oraz pełnioną funkcję w organizmie limfocyty dzielimy na różne subpopulacje obejmujące: centralne komórki pamięci (T_{cm}) obecne w narządach limfatycznych, efektorowe komórki pamięci (T_{em}) występujące w tkankach obwodowych [Niedźwiedzka-Rystwej i wsp. 2013], czy opisane w ostatnich latach komórki T_{RM} występujące w narządach nielimfatycznych i zaangażowane w ochronę w miejscach wnikania drobnoustrojów. Istnieje kilka modeli opisujących powstawanie odmiennych grup komórek pamięci. Badania Stemberger i wsp. wskazują, że pojedynczy limfocyt T może być prekurem heterogennej populacji limfocytów T pamięci. Stanowi to przesłanki do przyjęcia tzw. „modelu postępującego różnicowania” [Stemberger i wsp. 2007]. Zgodnie z tą hipotezą istnieje ścieżka różnicowania opierająca się na sile sygnału oraz stopniu aktywacji limfocytów. Efektem różnicowania limfocytów pamięci jest powstawanie komórek efektorowych (T_{eff}).

Analizy przeprowadzone w I cyklu badań i opisane w pracy Druszczyńska i wsp. [Publikacja A4] wykazały, iż jedną z przyczyn braku wytworzenia nadwrażliwości typu późnego na tuberkulinę u osób TST(-) mogła być osłabiona zdolność stymulowanych PPD komórek dendrytycznych do ekspresji receptorów sygnałowych (HLA-DR, CD86) w synapsie immunologicznej, której towarzyszyła nasiloną ekspresją IL-10 przez limfocyty obwodowe. Ponadto, istotnie słabsza produkcja IFN- γ przez limfocyty krwi obwodowej osób TST(-), w porównaniu do limfocytów osób TST (+), zaobserwowana zarówno w przypadku bezpośredniej stymulacji limfocytów antygenem PPD, jak i z

udziałem autologicznych KD pulsowanych PPD, stała się przesłanką do uznania IFN- γ jako markera indukowanej prątkami *M. bovis* BCG nadwrażliwości późnej na tuberkulinę.

Biorąc pod uwagę fakt, iż limfocyty o fenotypie CD4⁺ (w porównaniu do limfocytów CD8⁺ i komórek NK CD56⁺) stanowiły dominującą populację limfocytów odpowiadających produkcją IFN- γ na antygeny PPD i BCG prezentowane przez KD [Publikacja A4, Załącznik 3a Publikacja C7], jak i brak doniesień literaturowych na temat odpowiedzi limfocytów T CD4⁺ dziewiczych i pamięci w kontekście wywoływanej przez PPD nadwrażliwości późnej, postanowiłam w drugim cyklu pracy, stanowiącej osiągnięcie habilitacyjne, rozszerzyć dotychczasowe badania. Uwzględniono znaczenie tych komórek w odpowiedzi odpornościowej na prątki *M. bovis* BCG poprzez charakterystykę uwalnianych cytokin Th1/Th2 (IFN- γ i IL-10) przez limfocyty T CD4⁺ dziewicze i pamięci w odpowiedzi na antygen PPD i prątki BCG prezentowane przez KD.

Badania przeprowadzone z udziałem 60 osób zdrowych, szczepionych w dzieciństwie szczepionką BCG wskazały, iż pobudzane PPD lub BCG KD, stymulowały odpowiedź dziewiczych limfocytów T na niskim poziomie manifestującą się nieznaczną produkcją IFN- γ i IL-10. Z kolei w przeciwieństwie do limfocytów dziewiczych, limfocyty pamięci odpowiedziały intensywniejszą produkcją IFN- γ i IL-10 na PPD i BCG prezentowane przez KD. Procesowi temu towarzyszyły istotne zmiany w fenotypie i produkcji cytokin przez KD. Wykazano, iż pobudzane prątkami BCG KD charakteryzowały się istotnie wyższą ekspresją receptora CD86, zaangażowanego w formowanie II sygnału aktywacji w synapsie immunologicznej, w porównaniu do PPD oraz istotnym osłabieniem ekspresji receptora DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin) na powierzchni KD, w porównaniu do stymulowanych PPD KD oraz KD niestymulowanych [Publikacja A3]. Receptor DC-SIGN, znany jako białko CD209, kodowane u ludzi przez gen *CD209*, należy do receptorów lektynowych rozpoznających komponenty wielocukrowe prątków umożliwiając internalizację bakterii. Wykazano, iż prątki *Mycobacterium* (np. *M. tuberculosis*, *M. avium subsp. paratuberculosis* i *M. bovis* BCG), wnikają za pomocą DC-SIGN do wnętrza komórek dendrytycznych i makrofagów alweolarnych, w których mogą przetrwać [Geijtenbeek i wsp. 2003]. Głównym antygenem prątków wiążącym się z receptorem DC-SIGN jest mannozylo-LAM (man-LAM), który jest ważnym czynnikiem chorobotwórczości prątków [Ehlers 2010; Carroll i wsp. 2010]. Poprzez interakcje z receptorem mannozowym Man-LAM ogranicza tworzenie fagolizosomów w makrofagach oraz efekt działania IFN- γ ze strony limfocytów T [Fratti i wsp., 2003, Hmama i wsp. 2004]. Dotychczasowe wyniki badań wskazują na znaczenie mannozylicji lipoarabino-mannanu dla właściwości immunomodulacyjnych prątków. Wykazano zdolność mannozylowanego LAM do hamowania dojrzewania KD oraz produkcji IL-12 [Nigou i wsp. 2001, Nigou i wsp. 2002]. Wiązanie Man-LAM przez DC-SIGN indukuje wytwarzanie IL-10 przez KD [Geijtenbeek i wsp. 2003]. W pracy Szpakowski i wsp. [Publikacja A3] wykazano istotne nasilenie

produkcji IL-10 przez stymulowane BCG KD w porównaniu do KD niestymulowanych oraz stymulowanych PPD.

Kluczowe znaczenie w odporności przeciwprątkowej odgrywa odporność komórkowa typu Th1, w której rozwoju udział biorą cytokiny takie jak IL-12 i IL-23. Cechą charakterystyczną tych cytokin jest podobieństwo molekularne oraz zbliżony efekt działania przejawiający się indukcją produkcji IFN- γ i promocją limfocytów Th1. Jednym z kierunków ulepszenia działania stosowanej szczepionki BCG jest próba modyfikacji obecnie dostępnych szczepów BCG np. poprzez wprowadzenie obcych genów, których ekspresja zwiększałaby immunogenność szczepu. Białkiem rozpatrywanym jako potencjalny czynnik „ulepszający” obecnie stosowaną szczepionkę jest interleukina 18 (IL-18). Badania na modelu mysim wykazały nasiloną zdolność rekombinowanych prątków *M. bovis* BCG z ekspresją mysiej IL-18 do pobudzania produkcji IFN- γ [Biet i wsp. 2002] Interleukina 18 została opisana po raz pierwszy w 1989 roku, jako czynnik indukujący produkcję IFN- γ (*Interferon Gamma Inducing Factor* (IGFI) [Nakamura i wsp.1989. Jest to cytokina należąca do rodziny IL-1, produkowana przez monocyty, KD, makrofagi, komórki nabłonkowe, keratynocyty, fibroblasty, limfocyty T i B. Sekwencja aminokwasowa ludzkiej IL-18 jest w 65% homologiczna z mysią IL-18. Dokładna charakterystyka IL-18 obejmująca budowę cząsteczki, budowę receptora, oraz właściwości biologiczne została zaprezentowana w pracy przeglądowej Wawrocki i wsp. [Publikacja A10]. Obecnie wiadomo, że sama IL-18 nie jest w stanie indukować produkcji IFN- γ . Na poziomie molekularnym IL-12 i IL-18 działają synergistycznie [Gracie i wsp. 2003; Tominaga i wsp. 2000; Ahn i wsp. 1997]. W związku z wzmocnieniem efektów działania IL-12 przez IL-18, pojawiły się realne szanse wykorzystania tej cytokiny w nasilaniu odpowiedzi limfocytów Th1 lub komórek NK, w celu zwalczania patogenów bakteryjnych, których eliminacja jest zależna od skutecznych mechanizmów odporności komórkowej.

Wobec faktu, iż szczepionka BCG nie zapewnia u około 50-60% immunizowanych osób dostatecznie silnej odpowiedzi odpornościowej [Załącznik 3a Publikacja B13 i C6], postanowiono sprawdzić, czy IL-18 może nasilać interakcję komórek dendrytycznych z limfocytami dziewiczymi i pamięci prowadząc do wzmożonej produkcji IFN- γ , w grupie osób zdrowych, szczepionych w dzieciństwie szczepionką BCG. Ten etap pracy wymagał kontynuowania współpracy naukowej z Instytutem Pasteura w Lille, zainicjowanej przeze mnie w trakcie pobytu i wykonywania części pracy doktorskiej we Francji. W badaniach wykorzystałam stworzony przez dr Francka Bieta i wsp. rekombinowany szczep prątków BCG wydzielający ludzką IL-18 [Publikacja A3], który charakteryzował się podobnie jak stworzony wcześniej rekombinowany szczep BCG z ekspresją mysiej IL-18 (rBCGmIL-18) zdolnością do wydajniejszej, w porównaniu z wyjściowym szczepem BCG, produkcji IFN- γ . Ponadto badania te dowiodły, iż wzrost stężenia IFN- γ w odpowiedzi na stymulację PPD był istotnie skutkiem wydzielania aktywnej mysiej IL-18 przez rBCGmIL-18 co miało ogromne znaczenie w modulacji odpowiedzi immunologicznej w kierunku Th1 [Kremer i wsp 1999]. **Należy podkreślić, iż przedstawione wyniki zawarte w [Publikacji A3] są pierwszymi w**

piśmiennictwie światowym, które opisują wzmożoną immunomodulatorową właściwość prątków rekombinowanych z ekspresją ludzkiej IL-18 w porównaniu do wyjściowego szczepu BCG. Jako model do badań wybrałam grupę zdrowych młodych osób, w wieku 18-35 lat, które nigdy nie chorowały na gruźlicę, a które w wieku niemowlęcym i szkolnym zostały poddane obowiązkowemu szczepieniu BCG. Efekt działania IL-18 obserwowałam na różnych poziomach funkcjonowania komórek dendrytycznych, włączając analizę fenotypową i cytokinową. Biorąc pod uwagę udowodnioną zdolność IL-18 do wzbudzania ekspresji cząsteczek kostymulujących i cząsteczek adhezyjnych na powierzchni makrofagów i KD [Reddy i wsp. 2004; Gutzmer i wsp. 2003] w pierwszym etapie badań postanowiono sprawdzić jakie zmiany w fenotypie KD będą obserwowane w wyniku stymulacji prątkami rBCGhIL-18. Wykazano istotne nasilenie ekspresji cząsteczek kostymulujących CD86 i CD80 na KD stymulowanych rBCGhIL-18 w porównaniu do KD niestymulowanych. Ponadto stwierdzono, iż stymulowane rBCGhIL-18 KD wykazywały istotnie silniejszą ekspresję CD86 w porównaniu do KD stymulowanych PPD. Nie stwierdzono natomiast znamienych różnic w ekspresji receptora HLA-DR i CD40. Zaobserwowano ponadto, iż prątki rBCGhIL-18, podobnie jak BCG i PPD, zdolne były do indukowania istotnego spadku ekspresji receptora DC-SIGN na powierzchni KD w porównaniu do KD niestymulowanych. [Publikacja A3]. Obserwowanym zmianom w fenotypie KD stymulowanych rBCGhIL-18 towarzyszyły istotne zmiany w produkcji cytokin manifestujące się istotnym nasileniem produkcji IL-10 (udział w pobudzaniu limfocytów regulatorowych), IL-23 (istotna rola w pobudzaniu limfocytów Th pamięci) i chemokiny IP-10 (CXCL10) (udział w przyciąganiu limfocytów do węzłów chłonnych, biomarker zakażenia *M. tuberculosis*) w porównaniu do szczepu nierekombinowanego.

Wyniki badań przeprowadzone z udziałem szczepu rBCGhIL-18 prezentowanego przez KD jednoznacznie wskazały istotną zdolność pobudzania produkcji IFN- γ przez dziewicze limfocyty T i znacznie słabszą odpowiedź limfocytów pamięci. Ponadto, wykazano, iż stymulowane rBCGhIL-18 KD pobudzały istotnie dziewicze limfocyty T CD4⁺ do produkcji IL-10, podczas gdy KD stymulowane nierekombinowanym szczepem BCG preferencyjnie pobudzały limfocyty T CD4⁺ pamięci do produkcji tej cytokiny [Publikacja A3].

Uzyskane wyniki obrazujące istotny wpływ rBCGhIL-18 na: podwyższoną ekspresję receptorów zaangażowanych w drugi sygnał aktywacji synapsy immunologicznej (CD86, CD80), nasilenie produkcji IL-23 i IL-10 przez KD, a także silne pobudzenie limfocytów dziewiczych manifestujące się zwiększoną produkcją IFN- γ i IL-10 podkreślają wyróżniające właściwości tego szczepu jako silnego modulatora odpowiedzi odpornościowej i dostarczają cennej wiedzy o mechanizmach odpowiedzi przeciwprątkowej, które mogą być pomocne w programowaniu badań służących opracowaniu nowych szczepionek przeciwgruźliczych.

Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki w dalszej części pracy postanowiono sprawdzić, czy różnice w fenotypie i aktywności KD mogą być istotne z punktu widzenia rozwoju nadwrażliwości późnej na tuberkulinę u osób szczepionych BCG. Zadano pytanie, czy skoro KD stymulowane rBCGhIL-18 pobudzały limfocyty do produkcji IFN- γ , to czy taka właściwość może być jednakowo przypisana komórkom osób z odmienną reaktywnością na tuberkulinę TST(+) i TST(-)? Czy IL-18 uwalniana przez rBCGhIL-18 będzie wystarczająco silnym stymulatorem zdolnym do przełamania obserwowanej anergii odpowiedzi komórkowej osób z ujemnym odczynem tuberkulinowym, opisanej w pracy Druszczyńska i wsp. 2015 [Publikacja A4]? Aby odpowiedzieć na to pytanie, w kolejnej pracy Kowalewicz-Kulbat i wsp. 2018 [Publikacja A8] przeprowadzono badania z udziałem 71 zdrowych ochotników w wieku 25-30 lat uodpornianych w dzieciństwie szczepionką BCG, którzy na podstawie wartości odczynu tuberkulinowego zostali podzieleni na grupę osób TST(+) (średnica zaczerwienienia i stwardnienia ≥ 10 mm) i TST(-) (< 10 mm). W obu grupach badanych analizie poddano fenotyp KD (ekspresję CD86, CD80, CD40, DC-SIGN), produkcję cytokin (IL-10, IL-23, IP-10) oraz odpowiedź limfocytów dziewiczych i pamięci (IFN- γ i IL-10). Wykazano zmiany w fenotypie KD w obu grupach badanych manifestujące się istotnym osłabieniem ekspresji receptora DC-SIGN na stymulowanych PPD, BCG i rBCGhIL-18 KD osób TST(-), w porównaniu do KD osób TST(+). Ponadto, zaobserwowano istotne nasilenie ekspresji receptora CD40 na stymulowanych PPD, KD osób TST(+), ale nie TST(-), w porównaniu do KD niestymulowanych. Wykazano wzmożoną zdolność stymulowanych rBCGhIL-18 KD osób TST(+) i TST(-) do wydzielania IL-23 w porównaniu do KD stymulowanych szczepem nierekombinowanym. Biorąc pod uwagę kluczowe znaczenie limfocytów T CD4⁺ produkujących IFN- γ w rozwoju DTH na tuberkulinę, porównano w pracy odpowiedź limfocytów T dziewiczych CD4⁺ osób TST(+) i TST(-). Stwierdzono brak istotnych różnic w produkcji IFN- γ i IL-10 przez limfocyty dziewicze osób TST(+) i TST(-) w wyniku stymulacji KD PPD, BCG i rBCGhIL-18. Zaobserwowano jednak istotną zdolność prątków rBCGhIL-18 do nasilenia produkcji IFN- γ przez limfocyty dziewicze, w porównaniu do nierekombinowanego szczepu BCG. Z kolei limfocyty pamięci osób TST(-) wydzielały istotnie mniej IFN- γ w odpowiedzi na stymulację KD PPD, BCG i rBCGhIL-18, niż limfocyty pamięci osób TST(+). Należy w tym miejscu podkreślić, iż efekt ten nie był spowodowany odmienną liczbą limfocytów T pamięci CD4⁺ osób TST(+) i TST(-), bowiem liczba tych komórek w obu grupach badanych była podobna. Ponadto, zaobserwowano dodatnią korelację pomiędzy poziomem IFN- γ produkowanego przez limfocyty pamięci w odpowiedzi na stymulację PPD i BCG i rBCGhIL-18 prezentowanymi przez KD a średnicą odczynu tuberkulinowego.

W pracy oceniono także poziom IL-10 produkowanej przez limfocyty dziewicze i pamięci w odpowiedzi na prezentowane przez KD antygeny: PPD, BCG i rBCGhI-18. Wykazano brak istotnego wpływu antygenów prątków na poziom uwalnianej IL-10 przez limfocyty dziewicze. Co więcej, poziom IL-10 uwalnianej przez limfocyty osób TST(+) i TST(-) w odpowiedzi na stymulację KD

prezentującymi antygeny prątków pozostawał na podobnym poziomie. Z kolei limfocyty pamięci osób TST(-) produkowały istotnie intensywniej IL-10 w odpowiedzi na stymulację rBCGhIL-18 prezentowanymi przez KD w porównaniu do limfocytów pamięci osób TST(+). Należy jednak podkreślić, iż poziom IL-10 w tych hodowlach nie był istotnie wyższy w porównaniu do poziomu IL-10 uwalnianej przez same KD stymulowane rBCGhIL-18, co podkreśla kluczową rolę KD w produkcji tej cytokiny.

Nasilona zdolność rekombinowanego szczepu rBCGhIL-18, w porównaniu do nierekombinowanych prątków BCG, prezentowanych przez KD, do pobudzania silnej produkcji IFN- γ przez dziewicze limfocyty T CD4⁺ (w przeciwieństwie do limfocytów T CD4⁺ pamięci) sugeruje istnienie różnic w pochodzeniu, fenotypie i funkcji tych komórek [Publikacja A8]. Wyniki zaprezentowane w Publikacji A3 oraz Publikacji A8 stały się podstawą zaproponowania mechanizmu tłumaczącego brak wytwarzania DTH na tuberkulinę u osób z ujemnym odczynem tuberkulinowym i wskazały, iż pobudzane prątkami KD osób TST(+) i TST(-) posiadają odmienne właściwości wzbudzania produkcji IFN- γ . Można przypuszczać, iż obserwowany „defekt” limfocytów pamięci osób TST(-) mógł być efektem słabszych właściwości KD jako komórek prezentujących antygeny limfocytom T, w porównaniu do „kondycji” KD osób TST(+).

Biorąc pod uwagę:

- drastyczny spadek ekspresji DC-SIGN, którego skutkiem była osłabiona zdolność KD do interakcji z prątkami BCG i ich komponentami (tuberkulina wydzielana i zawarta w ciele prątków) [Publikacja A8]
- brak mobilizacji receptora CD40 na KD pod wpływem PPD [Publikacja A8]
- brak mobilizacji HLA-DR na stymulowanych PPD KD [Publikacja A4]
- nadprodukcję IL-10 w odpowiedzi na BCG przez KD [Publikacja A3]
- zredukowaną zdolność limfocytów pamięci immunologicznej do produkcji IFN- γ i brak wytworzenia DTH na tuberkulinę [Publikacja A8]

postawiono pytanie, **czy IL-18 może w jakimś stopniu przywrócić równowagę w funkcjonowaniu synapsy immunologicznej u osób TT-?**

Odpowiedź na to pytanie jest twierdząca, bowiem w środowisku IL-18 produkowanej przez rBCGhIL-18, komórki dendrytyczne zarówno osób TST(+), jak i TST(-) stymulowały limfocyty T CD4⁺ dziewicze do równie intensywnej produkcji IFN- γ , a właściwość ta pozostawała w związku z nasiloną produkcją IL-23 [Publikacja A8].

Za najważniejsze wnioski wypływające z tej części pracy uważam:

1. Wykazanie udziału receptorów DC-SIGN i CD86 KD w pobudzaniu produkcji IFN- γ przez pamięciowe limfocyty T CD4⁺ swoiste w stosunku do antygenów szczepionkowych prątków BCG i zawartych w PPD, któremu towarzyszy tylko znikoma reaktywność limfocytów T CD4⁺ dziewiczych.
2. Stwierdzenie defektu w produkcji IFN- γ przez limfocyty pamięci immunologicznej w odpowiedzi na antygeny BCG i PPD prezentowane przez KD, u osób z areaktywnością tuberkulinową i wskazanie na możliwy związek tego defektu z nadmierną tendencją KD do obniżania ekspresji DC-SIGN i brakiem mobilizacji receptorów HLA-DR i CD40
3. Udokumentowanie silnego pobudzenia limfocytów T CD4⁺ dziewiczych produkujących IFN- γ w hodowlach z KD stymulowanych prątkami rBCG produkującymi ludzką IL-18, zarówno w grupie ochotników TST(+), jak i TST(-), pozwala ostrożnie sugerować wzmocnioną aktywność immunogenną rekombinanta i rozważyć jego potencjalne zastosowanie jako immunomodulatora promującego silną odpowiedź typu Th1.

Cel 3

Porównanie morfologii, fenotypu receptorowego i aktywności sekrecyjnej komórek dendrytycznych uzyskiwanych z ludzkiej krwi obwodowej metodą pozytywnej i negatywnej separacji magnetycznej, jako cech potencjalnie istotnych dla aplikacyjnych zastosowań tych komórek.

- A5** Fol M., Nitecka-Błażlak A., Szpakowski P., Madiraju M.VVS., Rudnicka W., Druszczyńska M., Pestel J., **Kowalewicz-Kulbat M.** „Evaluation of two different dendritic cell preparations to BCG reactivity”. Archives of Biological Sciences 2016;68:263-271
- A6** **Kowalewicz-Kulbat M.**, Ograczyk E., Włodarczyk M., Krawczyk K., Fol M. Efficiency and impact of positive and negative magnetic separation on monocyte derived dendritic cells generation. Iranian Journal of Immunology 2016;13(2):132-140 doi: IJIV13i2A6.
- A7** **Kowalewicz-Kulbat M.**, Ograczyk E., Krawczyk K., Rudnicka W., Fol M. Type of monocyte immunomagnetic separation affects the morphology of monocyte-derived dendritic cells, as investigated by scanning electron microscopy. Journal of Immunological Methods 2016;439:79-82 doi: 10.1016/j.jim.2016.10.004.

Z uwagi na kluczowe znaczenie komórek dendrytycznych (KD) w odpowiedzi odpornościowej na prątki *Mycobacterium bovis* BCG, które opisano w badaniach w części I i II, podjęłam w części III bardziej szczegółową charakterystykę tych komórek z uwzględnieniem metody

ich uzyskiwania. To pozwala rozszerzyć wiedzę o istotnej roli, jaką odgrywają KD nie tylko w odpowiedzi na czynniki infekcyjne, ale także w nowotworach co może okazać się szczególnie ważne w kontekście wykorzystania ludzkich KD w immunoterapii. Badania nad biologią i zróżnicowaniem funkcjonalnym ludzkich KD postępowały znacznie wolniej niż w modelu mysim, z powodu ich słabej dostępności w tkankach organizmu i niewielkiego odsetka tych komórek występujących we krwi (około 0,2%). Dlatego też wiedza na temat morfologii, zróżnicowania, aktywności i funkcji tych komórek pochodzi głównie z badań przeprowadzonych w warunkach *iv vitro* w oparciu o analizę KD pozyskiwanych ze skóry, komórek prekursorowych CD34⁺ krwi, a zwłaszcza w drodze różnicowania monocytów krwi (CD14⁺). Przez długi czas sądzono, iż ludzkie KD wywodzą się bezpośrednio z monocytów. W 1994r Sallusto i Lanzavecchia opracowali system hodowli KD w warunkach *in vitro* i opisali nowy rodzaj komórek- KD pochodzenia monocytarnego (MoDCs). To odkrycie zrewolucjonizowało badania nad biologią ludzkich KD, a tym samym dało podstawę do rozwoju badań nad szczepionkami z udziałem KD [Sallusto i wsp.1994; Kastenmuller i wsp.2014]. Biorąc pod uwagę niezwykle zdolności KD jako komórek inicjujących i regulujących odpowiedź odpornościową, zostały one wykorzystane do przygotowywania szczepionek nie tylko w walce z drobnoustrojami, ale także z nowotworami [Santos i Butterfield 2018]. Cechami KD, które pełnią decydującą rolę w rozwoju nowych strategii terapeutycznych są: ich lokalizacja, sposób pochłaniania antygeny, dojrzewanie i występowanie wielu subpopulacji, które pełnią różne funkcje w organizmie [Steinman 2008]. Wraz z rozwojem metod badawczych i zaawansowanych technologii stało się możliwe w ostatnich latach uzyskiwanie KD w większej liczbie, co pozwoliło na ich szersze zastosowanie w celach terapeutycznych. Pierwszą próbę klinicznego zastosowania szczepionki z użyciem KD przeprowadził Hsu i wsp. u czterech pacjentów z chłoniakiem grudkowym. [Hsu i wsp. 1996]. W kolejnych latach najlichniesze, a zarazem najbardziej obiecujące próby kliniczne przeprowadzono u chorych na czerniaka złośliwego [Figdor i wsp. 2004; Turtle i wsp. 2004]. Podejmowane są także próby stosowania immunoterapii z udziałem KD u chorych na raka piersi, raka prostaty, w chorobach nowotworowych płuc, jelita grubego, przełyku, żołądka oraz szyjki macicy, a także u chorych z przewlekłą białaczką limfatyczną. Niektóre szczepionki przeciwnowotworowe z użyciem KD testowane są w I, II , a nawet III fazie badań klinicznych. [Santos i Butterfield 2018]. Badania z udziałem szczepionek zawierających KD testowane w ponad 200 próbach klinicznych odniesionych do 20 rodzajów nowotworów wskazały, iż ten nowy, eksperymentalny typ immunoterapii jest skuteczny, dobrze tolerowany i nie wywołuje częstych objawów ubocznych czy reakcji poszczepiennych. Badania kliniczne z wykorzystaniem KD prowadzone są w wielu ośrodkach na świecie, a w roku 2010 pierwsza szczepionka -Sipuleucel-T (Provenge® Dendreon) w postaci autologicznych KD stymulowanych białkiem fuzyjnym złożonym z antygeny swoistego dla komórek raka prostaty-kwaśnej fosfatazy sterczowej sprzężonego z GM-SCF uzyskała rejestrację Amerykańskiej Agencji ds Żywności i Leków-FDA [Kantoff i wsp 2010]. Jednak wciąż pozostają otwarte pytania dotyczące: typu subpopulacji KD najbardziej optymalnej z punktu widzenia

zastosowań aplikacyjnych, drogi podania i dawki antygeny do stymulacji KD czy drogi podania KD pacjentom (śródkórnice, dożylnie, bezpośrednio do węzłów chłonnych, czy bezpośrednio do wnętrza guza). Ze względu na wiele stosowanych technik przygotowania szczepionki (różne źródło, metody aktywacji i różnicowania KD), sposobu jej podawania oraz monitorowania odpowiedzi odpornościowej i klinicznej, interpretacja i porównanie wyników dotychczasowych doniesień jest trudne. Dlatego prowadzenie dalszych badań klinicznych z użyciem szczepionek z KD wymaga odpowiedniej standaryzacji.

Obecnie w badaniach nad biologią komórek dendrytycznych powszechnie wykorzystuje się komórki pochodzenia monocytarne, uzyskiwane z monocytów krwi obwodowej w trakcie 5-6 dniowych hodowli w środowisku cytokin (GM-CSF i IL-4). Dostępnych jest kilka protokołów pozyskiwania KD z monocytów (leukafereza, metoda adherencji, separacja magnetyczna, sorter z wykorzystaniem cytometrii przepływowej) [Meyer-Wentrup i Burdach 2003; Strasser i Eckstein 2010; Erdmann i Schuler-Thurner 2010; Hus i wsp. 2012, Neu i wsp. 2013; Bhattacharjee i wsp. 2017]. Należy zaznaczyć, że w zależności od sposobu różnicowania, otrzymuje się KD o nieco odmiennych właściwościach. Ostatnie badania transkryptomyczne, epigenetyczne oraz wielokolorowa cytometria przepływowa wskazały, iż monocyty w zależności od mikrośrodowiska cytokinowego w dynamiczny sposób mogą ulegać polaryzacji w różne subpopulacje KD, a proces ten istotnie nasila się w warunkach reakcji zapalnej. [Schultze i Aschenbrenner 2018; Leon i wsp. 2007]. Ponadto, biorąc pod uwagę, iż makrofagi, monocyty i komórki dendrytyczne pochodzenia monocytarne posiadają wiele wspólnych receptorów powierzchniowych, identyfikacja poszczególnych populacji stanowi wciąż wyzwanie. Dlatego Tang-Huau i Segura [Tang-Huau i Segura 2018] zaproponowali nowe kryteria identyfikacji komórek uwzględniające nie tylko fenotyp, ale także pochodzenie, morfologię i funkcje.

Biorąc pod uwagę wyniki badań opisanych w I i II celu osiągnięcia habilitacyjnego, wskazujące na możliwy mechanizm odpowiedzialny za brak wytworzenia DTH na tuberkulinę u szczepionych BCG osób TST(-) i znaczenie KD w tym procesie, jak również zilustrowane immunomodulatorowe właściwości prątków BCG, postawiono w ostatnim cyklu badań sprawdzić, czy sposób izolacji monocytów z krwi obwodowej, z których generuje się KD pochodzenia monocytarne może mieć znaczenie dla obserwowanego fenotypu, morfologii i aktywności sekrecyjnej pobudzanych prątkami komórek dendrytycznych. W swoich dotychczasowych badaniach wykorzystywałam KD pochodzące z monocytów uzyskiwanych metodą pozytywnej separacji magnetycznej-jednej z najczęściej stosowanych, chociaż kosztownych, metod izolacji. Metoda ta polegała na inkubacji komórek jednojądrzastych z kulkami magnetycznymi opłaszczonych mysimi monoklonalnymi przeciwciałami anti-ludzki CD14, a następnie izolacji przy użyciu kolumny i pola magnetycznego. Frakcja komórek CD14⁺ została zatrzymana w kolumnie, a następnie po usunięciu z pola magnetycznego wypłukana z kolumny. Z kolei reszta komórek, pozbawiona receptora CD14, została zebrana w postaci eluatu (frakcja CD14⁻). Przesłanką do prowadzenia badań z użyciem właśnie separacji magnetycznej była zarówno wysoka czystość uzyskiwanych monocytów, jak również

niewiele danych literaturowych opisujących wpływ tej metody izolacji na odpowiedź odpornościową generowanych KD. W toku rozwoju technologii oprócz pozytywnej separacji magnetycznej, stało się także możliwe użycie separacji negatywnej izolacji monocytów, z zastosowaniem koktajlu przeciwciał (anty-CD3, anty-CD7, anty-CD16, anty-CD19, anty-CD56, anty-CD123), w której pożądana frakcja monocytów była wyłukiwana jako pierwsza w postaci eluatu, a frakcja komórek CD14⁻ została zatrzymana w kolumnie. Technologia separacji magnetycznej MACS® jest łagodna dla komórek bowiem kulki paramagnetyczne są biodegradowalne, komórki pozostają żywe i aktywne, a separacja o wysokiej efektywności zajmuje mniej niż 30 minut. Wyizolowane frakcje charakteryzują się wysoką czystością i mogą być wykorzystane do dalszych aplikacji takich jak: cytometria przepływowa, analiza mikroskopowa, hodowla komórkowa, eksperymenty *in vivo* czy biologia molekularna.

W pracy Fol i wsp. 2016 [Publikacja A5] przeprowadzono badania, z udziałem zdrowych ochotników w wieku 25-35 lat, uodpornianych w dzieciństwie szczepionką BCG, których celem było porównanie reaktywności KD stymulowanych prątkami BCG uzyskiwanych z monocytów izolowanych za pomocą separacji pozytywnej i negatywnej, na podstawie oceny fenotypu KD (oceniono ekspresję receptorów CD86, CD80, CD40, HLA-DR i DC-SIGN), oraz produkcji cytokin (IL-10, IL-23, TNF- α). Wykazano brak istotnych różnic w fenotypie stymulowanych BCG, jak i niestymulowanych KD uzyskiwanych z monocytów separowanych metodą pozytywną i negatywną. Oba typy separacji nie spowodowały różnicy w ekspresji receptora DC-SIGN, ważnego w procesie rozpoznawania prątków BCG. Wykazano także, iż typ zastosowanej separacji nie powodował istotnych różnic w produkcji cytokin (IL-10, IL-23, TNF- α) przez KD niestymulowane oraz stymulowane prątkami BCG. Te spostrzeżenia są istotne z punktu widzenia otrzymywania KD dla celów terapeutycznych. Jednak niewątpliwie wysoka cena zastosowania separacji magnetycznej może stanowić poważną przeszkodę w szerszym zastosowaniu tej techniki w celach klinicznych, jak również w modelach eksperymentalnych, w których testowane są nowe immunomodulatory odpowiedzi odpornościowej, podobne do opisanego wcześniej rekombinanta rBCG_{HIL-18} [Publikacja A3, A8]. Dlatego, w kolejnej pracy stanowiącej osiągnięcie habilitacyjne podjęłam próbę sprawdzenia, czy zmniejszenie liczby rekomendowanych przez producenta ilości kulek paramagnetycznych o połowę, w obydwu typach separacji, co znacznie zmniejszyłoby koszty zastosowania tej techniki, wpłynęłoby na fenotyp uzyskanych monocytów. Badania przeprowadziłam z udziałem analogicznej grupy badanej, jak opisana w pracy Fol i wsp. [Publikacja A5]. W pracy Kowalewicz-Kulbat i wsp. 2016 [Publikacja A6] wykazano, iż typ separacji, w której zastosowano rekomendowaną oraz zmniejszoną o połowę liczbę kulek paramagnetycznych opłaszczonych przeciwciałami nie wpłynął istotnie na liczbę uzyskiwanych monocytów oraz procent komórek o fenotypie CD14⁺, który mieścił się w zakresie 85-95% w przypadku obu typów separacji. Nie zaobserwowano także istotnych różnic w wydajności i czystości uzyskiwanych monocytów, a także różnic w poziomie świecenia receptora CD14 na powierzchni monocytów uzyskiwanych metodą pozytywną i negatywną przy zastosowaniu rekomendowanej lub zredukowanej liczby kulek

paramagnetycznych. A zatem, wyniki uzyskane w prezentowanej pracy pozwoliły na wysunięcie wniosku, iż zmniejszenie liczby kulek paramagnetycznych o połowę nie wpłynęło istotnie na wydajność, czystość oraz ekspresję receptora CD14 na powierzchni monocytów [Publikacja A6]. Taka modyfikacja protokołu izolacji w sposób znaczący obniża koszt separacji co stanowi cenne spostrzeżenie z punktu widzenia wykorzystywania tej techniki do przygotowywania komórek dla celów badań eksperymentalnych i klinicznych.

Komórki dendrytyczne w czasie procesu różnicowania z monocytów i dojrzewania zmieniają zarówno swój kształt, jak i rozmiar. Z monocytów o kształcie okrągłym lub sferycznym przybierają postać komórek nieregularnych zawierających dendryty.[Verddijk i wsp 2004; Li i wsp 2012]. W kolejnym etapie pracy III cyklu badań oceniono fenotyp izolowanych z monocytów separacją pozytywną i negatywną KD niestymulowanych (komórki niedojrzałe), jak i stymulowanych LPS (komórki dojrzałe). Wykazano, iż w przypadku obu metod separacji, KD odpowiedziały na stymulację LPS istotnym wzrostem ekspresji receptorów CD86 i CD80. Zaobserwowane w mikroskopie świetlnym zmiany w morfologii KD stymulowanych LPS w porównaniu do KD niestymulowanych (w przypadku obu typów separacji) [Publikacja A5], jak i brak doniesień literaturowych dotyczących wpływu typu separacji magnetycznej na rozmiar KD pochodzenia monocytarnego przyczyniły się do podjęcia próby wykorzystania metody-mikroskopii skaningowej w celu porównania morfologii KD generowanych z monocytów uzyskiwanych metodą separacji pozytywnej i negatywnej. Krew do badań, podobnie jak w przypadku poprzednich analiz [Publikacja A5 i A6], uzyskano od zdrowych osób w wieku 31-34 lata, szczepionych w dzieciństwie szczepionką BCG. Wyniki zaprezentowane w pracy Kowalewicz-Kulbat i wsp. 2016 [Publikacja A7] wykazały **istotne różnice w morfologii KD niedojrzałych, jak i dojrzałych- stymulowanych LPS**. W przypadku separacji pozytywnej niedojrzałe KD wykazywały kształt nieregularny, a w przypadku negatywnej-kształt bardziej okrągły i regularny. Z kolei dojrzałe KD charakteryzowały się wydłużoną, rozgałęzioną morfologią (w przypadku selekcji pozytywnej) i smukłym, wydłużonym kształtem (w przypadku selekcji negatywnej). Dzięki pomiarowi wysokości komórek wykazano, iż typ separacji w sposób istotny wpływa na morfologię KD dojrzałych i niedojrzałych, ich kształt i wymiar. **Wykazano, iż wysokość KD niedojrzałych była istotnie wyższa w przypadku selekcji negatywnej niż pozytywnej. Różnica ta była jeszcze bardziej widoczna w przypadku dojrzałych KD. Należy podkreślić, iż ta niezwykle ciekawa obserwacja stanowi pierwsze tego typu doniesienie dotyczące KD pochodzenia monocytarnego i stanowi istotny wkład wiedzy w biologię KD z punktu widzenia optymalizacji metody uzyskiwania KD dla celów immunoterapeutycznych.**

Uzyskane wyniki będące efektem realizacji III celu badań prezentowanych w ramach osiągnięcia habilitacyjnego przyczyniły się do lepszego poznania biologii KD pochodzenia monocytarnego z punktu widzenia typu separacji magnetycznej podczas izolacji monocytów. Wykazano, iż zarówno separacja pozytywna, jak i negatywna pozwala na izolację monocytów z podobną wysoką wydajnością, czystością, zbliżonym procentem uzyskanych komórek z krwi

obwodowej i podobnym poziomem świecenia receptora CD14, a także pozwala na uzyskanie podobnego odsetka KD pochodzenia monocytarnego. [Publikacja A5 i A6] Jednak oba typy separacji monocytów pozwalają uzyskiwać KD różniące się morfologią, zwłaszcza KD dojrzałych, a zaobserwowane różnice w charakterystyce przestrzennej uzyskiwanych komórek mogą być ważne dla formowania synapsy immunologicznej KD z limfocytami, a także dla interakcji KD z innymi komórkami, zarówno bezpośredniej komórka-komórka, jak również pośredniej poprzez kształtowanie mikrośrodowiska cytokinowego. [Publikacja A7]

Za najważniejsze wnioski wypływające z tej części pracy uważam:

1. Sposób izolacji komórek dendrytycznych z monocytów krwi za pomocą pozytywnej i negatywnej separacji magnetycznej nie wpłynął istotnie na fenotyp, niestymulowanych oraz stymulowanych prątkami BCG, komórek dendrytycznych i profil uwalnianych cytokin (IL-10, IL-23, TNF- α).
2. Zastosowanie zmniejszonej o połowę niż rekomendowana liczby kulek paramagnetycznych opłaszczonych przeciwciałami stanowiących podstawę techniki separacji magnetycznej pozytywnej i negatywnej nie wpłynęło istotnie na procent uzyskiwanych monocytów i poziom świecenia receptora CD14
3. Rodzaj zastosowanej separacji magnetycznej (pozytywnej lub negatywnej) istotnie wpływa na kształt i wysokość komórek dendrytycznych pochodzenia monocytarnego, zarówno niedojrzałych, jak i dojrzałych po stymulacji LPS.

PODSUMOWANIE

Za najważniejsze osiągnięcie habilitacyjne uważam:

1. Wykazanie silnych immunomodulatorowych właściwości komórek dendrytycznych stymulowanych szczepionkowymi prątkami do wzbudzania odpowiedzi Th1 nawet w środowisku silnej polaryzacji odpowiedzi komórkowej w stronę Th2.
2. Udokumentowanie przydatności zastosowanego modelu ko-hodowli komórek dendrytycznych z limfocytami T CD4⁺ pamięci i dziewiczymi do monitorowania reakcji odporności adaptacyjnej na atenuowane prątki BCG.
3. Przedstawienie faktów pozwalających uznać brak skórnej reaktywności na tuberkulinę, u dużego odsetka osób szczepionych BCG, jako konsekwencji formowania nieefektywnej synapsy KD pobudzanych prątkowymi stymulatorami z limfocytami pamięci, charakteryzującą się znikomą produkcją IFN- γ poprzedzoną brakiem mobilizacji pewnych receptorów KD.

4. Wykazanie nowych właściwości rekombinowanych prątków rBCGhIL-18 produkujących ludzką IL-18 do nadawania komórkom dendrytycznym potencjału pobudzania dziewiczych limfocytów T CD4⁺ do produkcji IFN- γ , bez względu na rodzaj odczynu w teście tuberkulinowym
5. Zaobserwowanie, iż sposób izolacji komórek dendrytycznych pochodzenia monocytarnego istotnie determinuje ich właściwości morfologiczne, a zwłaszcza wysokość niedojrzałych i dojrzałych KD, które mogą być ważne dla formowania synapsy immunologicznej z limfocytami T.

Literatura

1. **Ahn HJ**, Maruo S, Tomura M, Mu J, Hamaoka T, Nakanishi K, et al. A mechanism underlying synergy between IL-12 and IFN-gamma-inducing factor in enhanced production of IFN-gamma. *Journal of Immunology* 1997;159(5):2125-31.
2. **Bhattacharjee J**, Das B, Mishra A, Sahay P, Upadhyay P. Monocytes isolated by positive and negative magnetic sorting techniques show different molecular characteristics and immunophenotypic behaviour. *F1000Research* 2017;6:2045.
3. **Biet F**, Kremer L, Wolowczuk I, Delacre M, Locht C. Mycobacterium bovis BCG producing interleukin-18 increases antigen-specific gamma interferon production in mice. *Infection and immunity* 2002;70(12):6549-57.
4. **Calmette A GC**. Sur quelques propriétés du bacilli tuberculeux d'origine bovine, cultivé sur la bile de boeuf glycinée. *Compt Rend Acad Sci* 1909;149:716-8.
5. **Cardona PJ**, Williams A. Experimental animal modelling for TB vaccine development. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases* 2017;56:268-73.
6. **Carroll MV**, Sim RB, Bigi F, Jakel A, Antrobus R, Mitchell DA. Identification of four novel DC-SIGN ligands on Mycobacterium bovis BCG. *Protein & Cell* 2010;1(9):859-70.
7. **Demangel C**, Garnier T, Rosenkrands I, Cole ST. Differential effects of prior exposure to environmental mycobacteria on vaccination with Mycobacterium bovis BCG or a recombinant BCG strain expressing RD1 antigens. *Infection and Immunity* 2005;73(4):2190-6.
8. **Ehlers S**. DC-SIGN and mannosylated surface structures of Mycobacterium tuberculosis: a deceptive liaison. *European Journal of Cell Biology* 2010;89(1):95-101.
9. **Erdmann M**, Schuler-Thurner B. Towards a standardized protocol for the generation of monocyte-derived dendritic cell vaccines. *Methods in Molecular Biology* 2010;595:149-63.
10. **Farber DL**, Yudanin NA, Restifo NP. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nature reviews Immunology* 2014;14(1):24-35.
11. **Figdor CG**, de Vries IJ, Lesterhuis WJ, Melief CJ. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nature Medicine* 2004;10(5):475-80.
12. **Fratti RA**, Chua J, Vergne I, Deretic V. Mycobacterium tuberculosis glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100(9):5437-42.
13. **Geijtenbeek TB**, Van Vliet SJ, Koppel EA, Sanchez-Hernandez M, Vandenbroucke-Grauls CM, Appelmek B, et al. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *Journal of Experimental Medicine* 2003;197(1):7-17.
14. **Gracie JA**, Robertson SE, McInnes IB. Interleukin-18. *Journal of Leukocyte Biology* 2003;73(2):213-24.
15. **Gutzmer R**, Langer K, Mommert S, Wittmann M, Kapp A, Werfel T. Human dendritic cells express the IL-18R and are chemoattracted to IL-18. *Journal of Immunology* 2003;171(12):6363-71.
16. **Herr HW**, Dalbagni G. Defining bacillus Calmette-Guerin refractory superficial bladder tumors. *The Journal of Urology* 2003;169(5):1706-8.
17. **Hewinson R**. TB vaccines for the World. *Tuberculosis* 2005;85(1-2):1-6.
18. **Hmama Z**, Sendide K, Talal A, Garcia R, Dobos K, Reiner NE. Quantitative analysis of phagolysosome fusion in intact cells: inhibition by mycobacterial lipoarabinomannan and rescue by an 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3-phosphoinositide 3-kinase pathway. *Journal of Cell Science* 2004;117(Pt 10):2131-40.
19. **Hsu FJ**, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, et al. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nature Medicine* 1996;2(1):52-8.
20. **Humphreys IR**, Stewart GR, Turner DJ, Patel J, Karamanou D, Snelgrove RJ, et al. A role for dendritic cells in the dissemination of mycobacterial infection. *Microbes and Infection* 2006;8(5):1339-46.
21. **Huppa JB**, Gleimer M, Sumen C, Davis MM. Continuous T cell receptor signaling required for synapse maintenance and full effector potential. *Nature Immunology* 2003;4(8):749-55
22. **Hus I.**, Wasiak M., Miłczek J., Roliński J. Generacja komórek dendrytycznych z monocytów krwi obwodowej chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową przy użyciu GM-CSF, IL-4 i TNF nie indukuje ich właściwości tolerogennych. *Acta Haematologica Polonica*, 2012;43(2):215-221.

23. **Kantoff PW**, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *The New England Journal of medicine* 2010;363(5):411-22.
24. **Kastenmuller W**, Kastenmuller K, Kurts C, Seder RA. Dendritic cell-targeted vaccines--hope or hype? *Nature Reviews Immunology* 2014;14(10):705-11.
25. **Kaufmann SH**. Tuberculosis vaccines: time to think about the next generation. *Seminars in Immunology* 2013;25(2):172-81.
26. **Korzeniewska- Kosela M**. Światowy Dzień Gruźlicy. W 2017 roku Światowy Dzień Gruźlicy obchodzony jest pod hasłem: Unite to End TB - Zjednoczmy się, by zwalczyć gruźlicę. Dostęp na dzień 31.07.2018 - <http://www.igichp.edu.pl/subpag/dzien17.html>
27. **Kremer L**, Dupre L, Wolowczuk I, Loch C. In vivo immunomodulation following intradermal injection with DNA encoding IL-18. *Journal of Immunology* 1999;163(6):3226-31.
28. **Leon B**, Lopez-Bravo M, Ardavin C. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity* 2007;26(4):519-31.
29. **Li DY**, Gu C, Min J, Chu ZH, Ou QJ. Maturation induction of human peripheral blood mononuclear cell-derived dendritic cells. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2012;4(1):131-4.
30. **Mempel TR**, Henrickson SE, Von Andrian UH. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* 2004;427(6970):154-9.
31. **Meyer-Wentrup F**, Burdach S. Efficacy of dendritic cell generation for clinical use: recovery and purity of monocytes and mature dendritic cells after immunomagnetic sorting or adherence selection of CD14+ starting populations. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research* 2003;12(3):289-99.
32. **Mostowy S**, Tsolaki AG, Small PM, Behr MA. The *in vitro* evolution of BCG vaccines. *Vaccine* 2003;21(27-30):4270-4.
33. **Nakamura K**, Okamura H, Wada M, Nagata K, Tamura T. Endotoxin-induced serum factor that stimulates gamma interferon production. *Infection and Immunity* 1989;57(2):590-5.
34. **Neu C**, Sedlag A, Bayer C, Forster S, Crauwels P, Niess JH, et al. CD14-dependent monocyte isolation enhances phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by proinflammatory, GM-CSF-derived macrophages *PLoS One*. 2013;8(6):e66898.
35. **Niedzwiedzka-Rystwej P**, Tokarz-Deptuła B, Deptuła W. Characteristics of T lymphocyte subpopulations. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 2013;67:371-9.
36. **Nigou J**, Gilleron M, Rojas M, Garcia LF, Thurnher M, Puzo G. Mycobacterial lipoarabinomannans: modulators of dendritic cell function and the apoptotic response. *Microbes and Infection* 2002;4(9):945-53.
37. **Nigou J**, Zelle-Rieser C, Gilleron M, Thurnher M, Puzo G. Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *Journal of Immunology* 2001;166(12):7477-85.
38. **Reddy P**. Interleukin-18: recent advances. *Current Opinion in Hematology* 2004;11(6):405-10.
39. **Rizzuti D**, Ang M, Sokollik C, Wu T, Abdullah M, Greenfield L, et al. *Helicobacter pylori* inhibits dendritic cell maturation via interleukin-10-mediated activation of the signal transducer and activator of transcription 3 pathway. *Journal of Innate Immunity* 2015;7(2):199-211.
40. **Rudnicka W**, Rudnicka K. 60 lat szczepień BCG. Osiągnięcia, przegrane i nadzieje – nowe szczepionki przeciwgruźlicze w programach klinicznych. *Postępy Mikrobiol.* 2008. 47: 379-385
41. **Rudnicka W**, Szpakowski P, Fol M, Chmiela M, Rudnicka K, Kowalewicz-Kulbat M. Ralph Marvin Steinman-Nobel 2011. Od komórki dendrytycznej do szczepionki. *Komórki dendrytyczne w zakażeniach. Sepsis* 2012. 6(5): 201-212
42. **Sallusto F**, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *Journal of Experimental Medicine* 1994;179(4):1109-18.
43. **Santos PM**, Butterfield LH. Dendritic Cell-Based Cancer Vaccines. *Journal of Immunology* 2018;200(2):443-9.
44. **Schultze JL**, Aschenbrenner AC. Systems immunology allows a new view on human dendritic cells. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2018.
45. **Steinman RM**. Dendritic cells *in vivo*: a key target for a new vaccine science. *Immunity* 2008;29(3):319-24

46. **Stemberger C**, Huster KM, Koffler M, Anderl F, Schiemann M, Wagner H, et al. A single naive CD8+ T cell precursor can develop into diverse effector and memory subsets. *Immunity* 2007;27(6):985-97.
47. **Strasser EF**, Eckstein R. Optimization of leukocyte collection and monocyte isolation for dendritic cell culture. *Transfusion Medicine Reviews* 2010;24(2):130-9.
48. **Tang-Huau TL**, Segura E. Human *in vivo*-differentiated monocyte-derived dendritic cells. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2018.
49. **Tominaga K**, Yoshimoto T, Torigoe K, Kurimoto M, Matsui K, Hada T, et al. IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1beta for IFN-gamma production from human T cells. *International Immunology* 2000;12(2):151-60.
50. **Turtle CJ**, Brown RD, Joshua DE, Hart DN. DC in multiple myeloma immunotherapy. *Cytotherapy* 2004;6(2):128-37.
51. **Verdijk P**, van Veelen PA, de Ru AH, Hensbergen PJ, Mizuno K, Koerten HK, et al. Morphological changes during dendritic cell maturation correlate with cofilin activation and translocation to the cell membrane. *European Journal of Immunology* 2004;34(1):156-64.
52. **Voss G**, Casimiro D, Neyrolles O, Williams A, Kaufmann SHE, McShane H, et al. Progress and challenges in TB vaccine development. *F1000Research* 2018;7:199.
53. World Health Organization. (2016) Global tuberculosis report 2016. World Health Organization. Dostęp na dzień 31.07.2018 - <http://www.who.int/iris/handle/10665/250441>
54. World Health Organization. (2017) Global tuberculosis report 2017. World Health Organization. Dostęp na dzień 31.07.2018 - http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr2017_main_text.pdf

5 Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Prace naukowe nie wchodzące w skład osiągnięcia są cytowane zgodnie z wykazem opublikowanych prac naukowych (Załącznik 3a pkt. B-D)

5a Działalność naukowa przed uzyskaniem stopnia doktora nauk biologicznych

Pierwsze zainteresowania badawcze miałam szansę rozwinąć w roku 1999/2000 w czasie V roku studiów magisterskich na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi kiedy w ramach przyznanego stypendium Socrates-Erasmus odbyłam 6-miesięczny staż w University Wolverhampton, Wielka Brytania w czasie, którego przygotowałam rozprawę zatytułowaną „*Helicobacter pylori*-infections, diseases and treatment” pod kierunkiem dr M.A. Kenwarda. Temat związany z zakażeniami wywoływanymi przez pałeczki *Helicobacter pylori* kontynuowałam w ramach pracy magisterskiej zatytułowanej „Reaktywność surowic pacjentów z dyspepsją, gruźlicą i chorobą wieńcową oraz zdrowych krwiodawców z antygenem *Helicobacter pylori*, oraz antygenem Hsp65 *Mycobacterium bovis* BCG”, którą obroniłam w 2000 r uzyskując tytuł magistra biologii, specjalność mikrobiologia. Pracę magisterską realizowałam w ówczesnym Zakładzie Biologii Infekcyjnej UŁ pod kierunkiem prof. dr hab. Wiesławy Rudnickiej. W trakcie studiów w latach 1996/1997, 1997/1998, 1998/1999 otrzymałam Listy Gratulacyjne Rektora UŁ a na zakończenie studiów w 2000r zostałam nagrodzona Medalem za Chlubne Studia.

W ramach realizacji pracy magisterskiej wysunięto hipotezę, iż zakażenia wywoływane przez *H. pylori* u osobników rozwijających odpowiedź komórkową typu Th2 pozostają częściej bezobjawowe niż u osobników reagujących na antygeny *H. pylori* odpowiedzią komórkową typu Th1, który to typ odpowiedzi odgrywa kluczową rolę zabezpieczającą przed chorobotwórczym działaniem *M. tuberculosis*. Dlatego celem badań realizowanych w ramach pracy magisterskiej była ocena częstości występowania przeciwciał klasy IgG przeciwko antygenom *H. pylori*, w surowicach osób z udokumentowanym zakażeniem *H. pylori* oraz chorych na gruźlicę. W wyniku przeprowadzonych badań wykazano wysoką częstość (78-100%) wykrywania przeciwciał klasy IgG przeciwko ekstraktowi glicynowemu (EG) *H. pylori* w surowicach chorych na gruźlicę, chorobę wieńcową, osób z dyspepsją i zakażeniem *H. pylori* oraz zdrowych krwiodawców co świadczyło o powszechności zakażeń *H. pylori* w populacji polskiej. Najwyższą częstość występowania przeciwciał klasy IgG anti-EG *H. pylori* oraz najwyższe średnie miano takich przeciwciał wykazano w surowicy pacjentów chorych na chorobę wieńcową. Fakt ten sugerował możliwy związek między zakażeniem *H. pylori* a chorobą wieńcową. Wyniki pracy magisterskiej zostały zawarte w 2 artykułach:

[Publikacje D1, D2] oraz w 8 doniesieniach konferencyjnych [L.1.a. 1,2,4,5,6,7,8,10].

W roku 2001 otrzymałam nagrodę Marszałka Województwa Łódzkiego w konkursie na najlepszą pracę magisterską z dziedziny nauk przyrodniczych w województwie łódzkim.

Po zakończeniu studiów magisterskich podjęłam studia doktoranckie (2000-2005) w ramach Stacjonarnego Studium Doktoranckiego Fizjologiczno-Mikrobiologicznego UŁ w Katedrze Immunologii i Biologii Infekcyjnej UŁ pod kierunkiem prof. dr hab. Wiesławy Rudnickiej. W roku 2003 zostałam zatrudniona na stanowisku asystenta w Katedrze Immunologii i Biologii Infekcyjnej UŁ. Rezultaty wcześniejszych badań **[Publikacja D1]** wykazały, iż wysoki odsetek (około 35%) osób młodych, szczepionych w dzieciństwie szczepionką BCG nie wytwarza nadwrażliwości typu późnego (DTH) pomimo otrzymania 3-5 dawek szczepionki BCG. Podejmując próbę wyjaśnienia tego zjawiska, w pracy doktorskiej skoncentrowałam swoje zainteresowania badawcze wokół komórek dendrytycznych jako profesjonalnych komórek prezentujących antygen i ich oddziaływaniu z prątkami BCG w kontekście nadwrażliwości późnej na tuberkulinę (DTH). Dlatego pierwszym celem pracy było porównanie reaktywności obwodowych limfocytów T, izolowanych od osób zdrowych szczepionych BCG, z ujemnym lub dodatnim odczynem tuberkulinowym, na antygeny prątków rozpuszczalne lub prezentowane przez komórki dendrytyczne. Uzyskane wyniki pozwoliły sugerować celowość wykorzystania komórek dendrytycznych w modelach *in vitro* oceny skuteczności szczepień BCG na podstawie obserwowanych efektów kooperacji prezentujących antygeny mykobakterii komórek dendrytycznych z autologicznymi limfocytami T **[doniesienie konferencyjne Ł.1.a.3,9,11; Ł.1.b.1,2]**.

W okresie 09-2002-06.2003r przebywałam na 9-miesięcznym stażu naukowym w Instytucie Pasteura w Lille we Francji w ramach 5 Programu Ramowego Unii Europejskiej (Marie-Curie Fellowship), podczas którego mogłam rozpocząć badania procesów komórkowych w astmie alergicznej rozwijając model *in vitro* komórek dendrytycznych stymulowanych antygenem silnie promującym odpowiedź Th1, jakim był nowo-skonstruowany przed dr Francka Bieta (z laboratorium Dr Camille Lochta) szczep rekombinowany BCG z ekspresją ludzkiej IL-18, (rBCGhIL-18). Celem II cyklu badań było sprawdzenie, czy badane kooperacje komórkowe między komórką dendrytyczną a limfocytom, opisane w I cyklu badań, odnoszące się do reakcji DTH na tuberkulinę, mogą mieć znaczenie w procesach nadwrażliwości typu wczesnego, w modelu astmy alergicznej indukowanej alergenem kurzu domowego *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p 1). Uzyskane wyniki badań (fenotypu komórek dendrytycznych oraz sekrecji cytokin) potwierdziły zakładaną rolę kooperacji prezentujących antygeny mykobakterii komórek dendrytycznych z autologicznymi limfocytami T w reakcji nadwrażliwości typu wczesnego. Wyniki I i II cyklu badań skłoniły do sformułowania dwóch głównych wniosków końcowych. Po pierwsze wykazano, iż przyczyną braku DTH na tuberkulinę u osób szczepionych BCG wykazujących ujemny test tuberkulinowy mogła być niedostateczna prezentacja antygenów *Mycobacterium* przez KD pochodzenia monocytarnego. Po drugie, uzyskane wyniki sugerowały zdolność prątków BCG, a zwłaszcza rBCGhIL-18 do modulowania profilu Th2 reakcji odpornościowej, charakterystycznej dla stanów alergicznych, w kierunku zrównoważonej odpowiedzi Th1/Th2.

Dysertacja doktorska zatytułowana „Dendritic cells as antigen presenting cells in immunological hypersensitivity” była podstawą nadania mi przez Radę Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego stopnia doktora w dziedzinie nauk biologicznych w dyscyplinie biologia, specjalność immunologia w dniu 22 marca 2005r. W roku 2005, moja praca doktorska została wyróżniona Indywidualną Nagrodą III stopnia Rektora UŁ.

Wyniki pracy doktorskiej zostały zawarte w doniesieniach konferencyjnych [**Ł.1.a. 9; Ł.1.b.1,2,3**].

W trakcie studiów doktoranckich brałam udział w badaniach prowadzonych w Zakładzie Biologii Infekcyjnej dotyczących określenia poziomu humoralnych mediatorów fagocytozy, MBL, sCD14, IgG przeciwko PPD oraz mykobakteryjnemu białku Hsp65, w surowicach zdrowych dawców szczepionych BCG w dzieciństwie, wykazujących dodatnią lub ujemną reakcję skórą na PPD. Nie stwierdzono znaczących różnic w poziomie badanych czynników w surowicach dawców TST(+) i TST(-). Nie stwierdzono również różnicy w pochłanianiu prątków BCG przez granulocyty i monocyty dawców TST(+) i TST(-). Uzyskane wyniki pozwoliły sugerować, iż zdolność makrofagów i granulocytów do pochłaniania mykobakterii jest wysoce międzyosobniczo zróżnicowana co może przynajmniej w pewnym stopniu tłumaczyć ograniczoną skuteczność protekcyjną szczepień BCG, ocenianą średnio na 50% i może być pomocniczym wyznacznikiem w pracach nad nowymi szczepionkami przeciwgruźliczymi. [**Publikacja D1, doniesienie konferencyjne Ł.1.a.3**].

5b Kontynuacja pracy naukowej-po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora, w wyniku przeprowadzonego postępowania konkursowego, w dniu 1.07.2005r, zostałam zatrudniona w Katedrze Immunologii i Biologii Infekcyjnej na stanowisku adiunkta. Bezpośrednio po zakończeniu etapu związanego z realizacją rozprawy doktorskiej kontynuowałam rozwój swoich zainteresowań naukowych dotyczących oddziaływań komórek dendrytycznych z prątkami *M. bovis* BCG w celu lepszego zrozumienia mechanizmów towarzyszących odpowiedzi odpornościowej na szczepionkę BCG. Jest to szczególnie ważne z punktu widzenia próby wyjaśnienia braku wystarczającego efektu protekcyjnego szczepionki BCG u osób dorosłych, a także rozwoju badań nad konstruowaniem nowych szczepionek. W pierwszym etapie badań sprawdzono, czy niezdolność pewnych osób do rozwoju DTH na tuberkulinę w odpowiedzi na szczepionkę BCG może pozostawać w związku z pewną nadprodukcją IL-10, której towarzyszy hamowanie wytwarzania IFN- γ , a w konsekwencji osłabienie adaptacyjnej odporności komórkowej. Istotnie, uzyskane wyniki potwierdziły znacznie częstszą produkcję IL-10 przez stymulowane PPD lub żywymi prątkami BCG komórki dendrytyczne ochotników TST(-) niż TST(+) [**Publikacja C4**]. W kolejnym etapie prac, w badaniach Rudnicka i wsp. [**Publikacja C6**] wykazano ogromną heterogenność odpowiedzi na szczepionkę BCG przejawiającą się zarówno na poziomie reakcji skórnej na tuberkulinę, jak i ekspresji genów oraz cytokin produkowanych w odpowiedzi na antygeny mykobakterii [**Publikacja C6**]. Analiza produkcji cytokin IFN- γ , IL-12 oraz TNF- α w stymulowanych

PPD lub żywymi prątkami BCG hodowlach pełnych zawiesin jednojądrzastych leukocytów krwi obwodowej ochotników TST(-) i TST(+) nie wykazała istotnych różnic międzygrupowych. Następnie oceniono związek pomiędzy ekspresją monocytarnych receptorów przekazywania sygnałów i odpornością komórkową na szczepionkę BCG określaną na podstawie nadwrażliwości późnej na tuberkulinę. Różnice pomiędzy grupą osób z dodatnim i ujemnym odczynem tuberkulinowym oceniono równoległe na poziomie ekspresji genów i ekspresji receptorów CD14 i TLR na monocytach izolowanych z krwi obu grup badanych. Zaobserwowano istotny spadek ekspresji receptora CD14 na monocytach osób TST(+) w porównaniu do monocytów osób TST(-) izolowanych z wykorzystaniem adherentnych właściwości tych komórek. Jednak w przypadku izolacji monocytów z użyciem separacji magnetycznej, monocyty obu grup badanych wykazywały podobną ekspresję CD14. Uzyskane wyniki uwiarydliły istotną rolę metodyki uzyskiwania frakcji monocytarnej krwi w ocenie właściwości badanych komórek. Wykazano także, iż adherentne monocyty wykazywały nasiloną ekspresję CD14 w środowisku PPD (w obu grupach badanych), podczas gdy żywe prątki *M. bovis* BCG nie powodowały zmiany w ekspresji tego receptora [**Publikacja B1**]. Z uwagi na fakt, iż podczas aktywacji monocytów/makrofagów receptor CD14 tworzy kompleks sygnałowy z receptorem TLR2 postanowiono rozszerzyć badania o ocenę ekspresji tego receptora. Nie zaobserwowano żadnej różnicy w ekspresji cząsteczki TLR2 na świeżo izolowanych monocytach ochotników TST(+) i TST(-). Nie stwierdzono także korelacji pomiędzy polimorfizmem TLR2 Arg753Gln a wytworzeniem DTH na tuberkulinę, a także pomiędzy polimorfizmem *cd14/-159C/T* a stężeniem sCD14 w surowicy [**Publikacja B1, doniesienie konferencyjne L.2.a.4; L.2.b.5,10**]. Kolejne badania nie wykazały występowania zależności między polimorfizmem *cd14/-159C/T* i zachorowalnością na gruźlicę [**Publikacja C3**].

W tym czasie włączyłam się także w nurt badań realizowanych w Katedrze Immunologii i Biologii Infekcyjnej UŁ dotyczących zagadnień związanych z występowaniem gruźlicy, w tym gruźlicy latentnej (zjawisko to opisano szerzej w pracy przeglądowej Drusczyńska i wsp. 2012 [**Publikacja B20**]). Podjęto próbę wytypowania wskaźników charakteryzujących stan załamania odporności przeciwprątkowej, który może sprzyjać reaktywacji latentnego zakażenia *M. tuberculosis* w aktywną gruźlicę [**Publikacja B6**]. Przeprowadzone doświadczenia pozwoliły na sformułowanie wniosku, że załamanie odporności przeciwprątkowej sprzyjającej reaktywacji latentnego zakażenia *M.tuberculosis* do aktywnej gruźlicy może, w pewnym stopniu, być efektem nadreaktywności prozapalnej makrofagów wyrażającej się niezależną od TLR2 nadekspresją receptora CD14, rozpuszczalną formą CD14 oraz ekspresją integryny LFA-1 regulującej międzykomórkowe interakcje leukocytów oraz ich wewnątrzustrojową migrację [**Publikacja B6**].

W związku z faktem, iż zakażenia latentne stanowią poważny problem w zwalczaniu gruźlicy, istnieje potrzeba opracowywania wiarygodnych testów do wykrywania latentnej gruźlicy i monitorowania stanów poprzedzających konwersję do aktywnej postaci choroby. W badaniach z udziałem grupy osób chorujących i nie chorujących na gruźlicę, oprócz klasycznej diagnostyki metodami

mikrobiologicznymi, wykonano skórny test tuberkulinowy oraz test interferonowy IGRA. Wykazano, iż testy IGRA nie cechowały się wyższą czułością niż test tuberkulinowy w wykrywaniu gruźlicy płucnej, w tym również jej postaci skąpoprątkowej. Nawet diagnostyka oparta na użyciu obu testów jednocześnie nie zwalnia z konieczności wykonania klasycznych badań stosowanych w diagnostyce gruźlicy, które wciąż stanowią złoty standard w wykrywaniu chorych z aktywną gruźlicą. Wykazano także, że oba testy mogą być pomocne w diagnostyce zakażeń latentnych **[Publikacja B13]**.

Innym zagadnieniem związanym z tematyką prątków *Mycobacterium*, są badania przeprowadzone w regionie łódzkim, w których porównano wirulencję klinicznych izolatów prątków *M. tuberculosis* oceniając wrażliwość szczepów na różne stężenia defensyny HNP-1 oraz intensywność produkcji IL-12 i tlenku azotu (NO) przez zakażane prątkami makrofagi wysięku otrzewnowego myszy **[Publikacja B8, doniesienie konferencyjne Ł.2.a.25]**. W kolejnych pracach oceniono produkcję IL-12 i NO przez makrofagi mysie stymulowane izolatami klinicznymi z regionu łódzkiego i porównano ze szczepem wirulentnym *M.tb* H37Rv. Wykazano, iż szczepy kliniczne stymulowały makrofagi mysie do słabszej produkcji IL-12 i NO, w porównaniu do szczepu wzorcowego H37Rv. Nie wykazano natomiast istotnego związku pomiędzy produkcją IL-12 a NO przez makrofagi stymulowane szczepami klinicznymi. **[Publikacja B11, doniesienie konferencyjne Ł.2.a.25]**. W innych pracach podjęto próbę zrozumienia mechanizmów umożliwiających prątkom gruźlicy przetrwanie wewnątrz komórek jednojądrzastych fagocytów. Wykorzystano dwa mutanty *M.tb*, z których jeden posiadał podwyższony poziom regulatorowego białka MtrA (szczep Rv-78), a drugi wykazywał podwyższony poziom białka regulatorowego z defektem w zakresie fosforylacji MtrA_{D53N} (szczep Rv-129). Wykazano, że oba szczepy prątków w podobnym stopniu obniżały ekspresję cząsteczek MHC klasy II na ludzkich monocytach, a także w podobnym zakresie wzbudzały ekspresję genu kodującego katepsynę G (*catG*) w infekowanych ludzkich monocytach krwi obwodowej oraz linii komórkowej THP-1. Ponadto, stymulacja żywymi prątkami obu szczepów, jednojądrzastych monocytów krwi obwodowej skutkowała wzrostem produkcji IL-10, ale nie indukowała wydzielania IL-12 oraz NO. Dzięki zastosowaniu techniki mikroskopii konfokalnej wykazano, że w komórkach linii makrofagowej THP-1 fagosomy z mutantem Rv-78 podlegały częstszej kolokalizacji z markerami LAMP-1 i Rab7 (charakterystycznymi dla późnych fagosomów) w porównaniu do fagosomów zawierających w pełni zjadliwy szczep, czy też szczep z defektem w zakresie fosforylacji MtrA. Stanowiło to dowód, iż zwiększonej ekspresji białka MtrA towarzyszyło zmniejszenie zdolności *M.tb* do ograniczania dojrzewania fagosomów, tym samym lepszego połączenia z lizosomami, czego konsekwencją mogło być zmniejszone przeżywanie takiego szczepu w fagocytach **[Publikacja B7]**. Z kolei w pracy Fol i wsp.2013 **[Publikacja B9]** badano konsekwencje delekcji genu *lysX* (uczestniczącego w przyłączaniu lizyny do fosfatydyloinozytolu) w wewnątrzkomórkowym przeżywaniu *M.tb* w fagocytach. Badania wykazały, iż pozbawienie *M.tb* genu *lysX* (mutant *Mtb lysX*) skutkowało zaburzeniem stosunku lipidów obdarzonych ładunkiem ujemnym i dodatnim co prowadziło do nasilenia produkcji TNF- α i IL-6, ale nie IL-10 przez

monocyty krwi obwodowej. W monocytach infekowanych *M.tb lysX* lub szczepem komplementarnym (*Mtb compl*) z ponownie wbudowanym genem *lysX*, nie obserwowano żadnych zmian w ekspresji cząsteczek MHC klasy II na makrofagach oraz ekspresji indukowalnej syntazy tlenu azotu. Wykazano natomiast zintensyfikowaną ekspresję genu kodującego katepsynę G w fagocytach zakażanych mutantem *M.tb lysX*, w porównaniu do szczepu niezmienionego. Uzyskane wyniki wskazały, iż pozbawienie prątków *M.tb* genu *lysX* prowadzi do osłabienia jego zdolności do przeżywania wewnątrz komórek gospodarza [**Publikacja B9, doniesienie konferencyjne Ł.2.b.13**].

Uzupełnieniem tematyki związanej z prątkami *Mycobacterium* są dwie prace przeglądowe, których jestem współautorem. W pierwszej z prac przedstawiono charakterystykę prątków niegruźliczych – *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. xenopi* oraz zmian klinicznych przez nie wywoływanych [**Publikacja B19**]. Z kolei druga praca dotyczy zagadnień związanych ze szczepionką BCG i porusza między innymi temat strategii opracowywania nowych profilaktycznych szczepionek przeciwgruźliczych [**Publikacja B18**]. Praca ta stanowiła cenny wstęp do przygotowania innej pracy przeglądowej poświęconej oddziaływaniu komórek dendrytycznych z prątkami *M. bovis* BCG [**Publikacja C10**].

Biorąc pod uwagę znaczące zdolności rekombinowanego szczepu z ekspresją ludzkiej IL-18 jako silnego stymulatora odpowiedzi Th1 (zagadnienie to szczegółowo omówiono w celu II Załącznika 2a) postanowiono sprawdzić aktywność prątków rekombinowanych z ekspresją mysiej IL-18 (rBCGmIL-18) w stanie immunosupresji wywołanej cyklofosfamidem (CTX) w modelu mysim. Szczegółowo zagadnienie związane z immunosupresją omówiono w pracy przeglądowej, której jestem współautorem. [**Publikacja B21**]. Doniesienia naukowe wskazują, iż stan immunosupresji może sprzyjać przejściu ze stanu latentnego zakażenia prątkami gruźlicy w postać aktywną. Sformułowano zatem pytanie, czy IL-18 może w jakiś sposób przeciwdziałać reaktywacji latentnych zakażeń *M.tb*. Próba odpowiedzi na to pytanie stały się badania realizowane w ramach przyznanego w 2014r projektu badawczego finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki (2013/11/B/NZ6/01304) „Immunologiczne podstawy udziału IL-18 w odpowiedzi komórkowej na *Mycobacterium bovis* BCG u myszy z obniżoną odpornością i immunokompetentnych”, którego jestem wykonawcą. W pierwszej części badań ustawiono model immunosupresji wywołanej CTX u myszy. Ta część badań została opublikowana w 1 pracy oryginalnej [**Publikacja B17**] oraz **4 doniesieniach konferencyjnych Ł.2.a.28,32,43; Ł.2.b.19**]. W kolejnym etapie oceniono wpływ prątków rBCGmIL-18 i BCG na: proliferację splenocytów i węzłów chłonnych [**doniesienie konferencyjne Ł.2.a.34**], morfologię krwi [**doniesienie konferencyjne Ł.2.a.36**], odpowiedź komórek pamięci centralnej i efektorowej [**doniesienie konferencyjne Ł.2.a.37,39**], a także **fagocytozę makrofagów** [**doniesienie konferencyjne Ł.2.a.42**] w grupie myszy z immunosupresją w odniesieniu do myszy immunokompetentnych. Analiza wyników uzyskanych w ostatnim etapie prac, jak i sformułowanie wniosków końcowych z przeprowadzonego projektu planowane jest na drugą połowę 2018r.

Prątki *Mycobacterium* nie są jedynym zagadnieniem wchodzącym w skład moich zainteresowań badawczych. Po obronie pracy doktorskiej nadal kontynuowałam współpracę z zespołem kierowanym przez prof. dr hab. Magdalенę Mikołajczyk-Chmielę z Pracowni Gastroimmunologii UŁ. Celem współpracy było określenie humoralnych parametrów immunologicznych charakteryzujących stan zakażenia *H. pylori*. W pracy Grębowska i wsp. 2006 [Publikacja C2] wykazano, że LPS *H. pylori* może być rozpatrywany jako jeden z czynników ryzyka wystąpienia niedokrwiennej choroby serca. Zaobserwowano nadprodukcję przeciwciał IgG i IgA przeciwko powierzchniowym antygenom *H. pylori*, nadprodukcję przeciwciał klasy IgG przeciwko determinantom Lewis XY obecnym w LPS wielu szczepów *H. pylori*, a także zawyżony poziom białek uczestniczących w interakcji LPS z makrofagami-sCD14 i LBP (ang. *lipopolysaccharide-binding protein*) [Publikacja C1, C2, doniesienie konferencyjne Ł.2.a.5]. Badania w zakresie oddziaływania pałeczek *H. pylori* z komórkami gospodarza rozszerzono poprzez wykazanie, iż determinanty Lewis XY są rozpoznawane przez receptory DC-SIGN (ang. *dendritic cell specific ICAM grabbing nonintegrin*), a proces ten zależy od obecności fukozy, podczas gdy wiązanie struktur nie zawierających antygenów Lewis było uzależnione od występowania galaktozy [Publikacja B5]. Kontynuując doświadczenia z udziałem pałeczek *H. pylori*, w kolejnej pracy analizowano efekt oddziaływania rozpuszczalnych składników *H. pylori*, takich jak: antygeny zawarte w ekstrakcie glicynowym (GE), podjednostka A ureazy (UreA), białko CagA i LPS na proces gojenia się ran poprzez analizę aktywności proliferacyjnej i metabolicznej komórek, a także badanie cyklu komórkowego. Dzięki nawiązanej współpracy z dr Pauliną Sicińską z Katedry Biofizyki UŁ udało się ustawić i zastosować model badania cyklu komórkowego z użyciem cytometrii przepływowej w nowym projekcie badawczym z użyciem linii komórkowej ludzkich komórek nowotworowych raka żołądka oraz fibroblastów. Wykazano, iż zastosowany w wysokim stężeniu LPS *H. pylori* hamował istotnie żywotność komórek obu linii czemu towarzyszyły istotne zmiany w cyklu komórkowym związane z zatrzymaniem komórek linii AGS w fazie S, a fibroblastów w fazie G2 cyklu komórkowego. Uzyskane wyniki potwierdziły ważny udział LPS *H. pylori* w procesie zatrzymania cyklu komórkowego. Wyniki uzyskane w tej części badań zostały opublikowane w jednej pracy oryginalnej [Publikacja B15] i doniesieniu konferencyjnym Ł.2.b.16.

Badania związane z analizą cyklu komórkowego prowadziłam także z użyciem ludzkiej linii komórkowej raka nadnerczy (H295R), dzięki nawiązanej w 2008 roku współpracy z dr hab. Hanną Ławnicką i dr Ewelina Motylewską z Zakładu Immunoendokrynologii Uniwersytetu Medycznego. Celem współpracy była ocena wpływu naturalnych inhibitorów MEK (laktonów L-783, 277 kwasu resorcylowego) [Publikacja B2] oraz DMAT (inhibitor CK2, 2-dimetyloamino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazole) [Publikacja B3] na proliferację i cykl komórkowy linii nowotworowej H295R. Wykazano, iż zastosowane inhibitory hamowały istotnie proliferację komórek linii nowotworowej czemu towarzyszyły istotne zmiany w cyklu komórkowym oraz indukcja apoptozy.

[Publikacja B2, B3]. Uzyskane wyniki dostarczyły cennej wiedzy na temat potencjalnego wykorzystania badanych inhibitorów w leczeniu nowotworów. Kontynuacją owocnej współpracy z Zakładem Immunoendokrynologii UM było opublikowanie kolejnych dwóch prac, których celem była ocena bezpośredniego wpływu preparatów o działaniu antyangiogennym (rapamycyna, interferon alpha) na wzrost szczurzej linii pheochromocytona PC12 (guzy chromochłonne) **[Publikacja B10]** oraz wpływu tych preparatów na wzrost dwóch neuroendokrynych linii: rakowiaka oskrzela H727 oraz raka rdzeniastego tarczycy (medullary thyroid cancer) **[Publikacja B12]**. Zaobserwowano silny efekt inhibicyjny działania preparatów na obie linie komórkowe co pozwala przewidywać szansę na wykorzystanie tych inhibitorów w leczeniu nowotworów neuroendokrynych.

Dzięki nawiązanej w 2015r współpracy z dr Katarzyną Kustrzepą i dr Katarzyną Ludzik z Katedry Chemii Fizycznej UŁ krąg moich zainteresowań naukowych poszerzył się o badanie działania przeciwdrobnoustrojowego surfaktantów kationowych, które mogłyby znaleźć zastosowanie jako składnik preparatów odkażająco-myjących oraz środków zapobiegających rozwojowi bakterii i grzybów. Wykazano, iż spośród badanych surfaktantów, dwa- bromek dodecyleno 1,12 bis (dimetylooktyloamonowy) oraz bromek dodecyleno 1,14 bis (dimetylooktyloamonowy) wykazują znaczące właściwości przeciwbakteryjne względem drobnoustrojów Gram-dodatnich (*Staphylococcus aureus*), jak i Gram-ujemnych (*Pseudomonas aeruginosa*), a także przeciwgrzybiczych względem *Candida albicans*. Cennym spostrzeżeniem był fakt, iż badane surfaktanty w roztworze wodnym charakteryzują się dużą stabilnością i wykazują nadal bardzo silne właściwości przeciwdrobnoustrojowe nawet po 3 miesiącach ich przechowywania. A zatem zastosowanie w przyszłości tych substancji w przemyśle stanowi realną alternatywę, jakkolwiek preparaty te wymagają kontynuacji badań z uwzględnieniem ich szerszego działania w stosunku do większej liczby drobnoustrojów patogennych. Wyniki uzyskanych badań zostały opublikowane w postaci jednej pracy oryginalnej **[Publikacja B16]** oraz dwóch **doniesień konferencyjnych Ł.2.a.31 oraz Ł.2.b.17]**. Ponadto, oba surfaktanty stały się podstawą dwóch zgłoszeń patentowych, które szczegółowo opisano w Załączniku 3a, punkt E.

Moja współpraca z Wydziałem Chemii Uniwersytetu Łódzkiego jest nadal kontynuowana i w roku 2017 na zaproszenie redakcji czasopisma „Kwartalnik Chemiczny” opublikowałam trzy artykuły poglądowe na temat: podatności kosmetyków na zakażenia mikrobiologiczne **[Publikacja C11]**, psucia się kosmetyków jako rezultatu zanieczyszczenia mikrobiologicznego **[Publikacja C12]** oraz ryzyka mikrobiologicznego związanego z zanieczyszczeniem wody stosowanej do produkcji preparatów kosmetycznych i farmaceutycznych **[Publikacja C13]**.

Jednym z ważnych elementów mojej działalności naukowej po uzyskaniu stopnia doktora było poszerzenie wiedzy z zakresu stosowanych metod statystycznych w badaniach biologicznych. Odbyte liczne kursy statystyczne i udział w seminariach statystycznych, które opisano szczegółowo w Załączniku 3a punkt K, stworzyły mi możliwość zastosowania wielu analiz

w badaniach własnych, jak i podzielenia się wiedzą i doświadczeniem z pracownikami, doktorantami i studentami Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UŁ (np. Micota i wsp. J Med. Microbiol. 2016;65:1171-1181 punkt Acknowledgments-podziękowania). Znajomość metod statystycznych stała się także podstawą nawiązanej w 2006r współpracy z dr hab. Dorotą Rybaczek z Katedry Cytofizjologii UŁ, w ramach której byłam w latach 2008-2015 wykonawcą dwóch projektów badawczych (“Ability of prematurely condensed chromatin to replicate DNA in mitosis” 2008-2011 i “Chromatin, chromatids and chromosomes during the course of prematurely induced mitoses and their behavior within the second round of the nuclear replication and division POMOST/2011-4/8” 2012-2015), w których byłam odpowiedzialna za statystyczną analizę danych. Wyniki badań zostały opublikowane w postaci dwóch prac oryginalnych [**Publikacja B4, C5**].

Na posiedzeniu Rady Instytutu Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii UŁ w dniu 15 czerwca 2018r przedstawiłam tezę mojej rozprawy habilitacyjnej, które zostały przyjęte jednomyślnie.

Dalsze plany badawcze

Moje dalsze plany badawcze nadal będą się koncentrować na komórkach dendrytycznych, które stanowią fascynujący model badawczy zarówno z punktu widzenia dalszego rozwoju wiedzy na temat ich oddziaływania z prątkami *Mycobacterium*, a także w innych modelach badawczych, na przykład obejmujących próbę określenia właściwości immunomodulujących nowych biopreparatów zdolnych do osłabiania reakcji zapalnej toczącej się w drogach oddechowych. Inspiracją do podjęcia tego tematu stało się opublikowanie w roku 2016, we współpracy z zespołem kierowanym przez prof. Milтона S da Costę-wybitnego specjalistę w dziedzinie badania drobnoustrojów środowisk ekstremalnych, z University of Coimbra, Portugalia, pracy (**Publikacja B14 Albuquerque et al. 2016***), w której po raz pierwszy opisaliśmy nowy gatunek archeonu halofilnego *Halorhabdus rudnickae*, wyizolowanego ze złoża poeksploatacyjnego „Barycz” znajdującego się na terenie Kopalni soli w Wieliczce. Dzięki nawiązaniu w 2016r niezwykle efektywnej współpracy z Kopalnią soli w Wieliczce oraz w Bochni, razem z Zespołem Genetyki Drobnoustrojów UŁ, kierowanym przez dr hab. Pawła Stączka oraz Pracownią Mikrobiologii Ogólnej kierowaną przez dr hab. Dominikę Drzewiecką, prowadzę intensywnie badania związane z próbą wyizolowania nowych gatunków archeonów halofilnych znajdujących się w solankach, w powietrzu i w kryształach soli znajdujących się na terenie obu kopalni. Nadrzędnym celem tych badań jest jednak nie tylko identyfikacja tych drobnoustrojów, ale sprawdzenie w jaki sposób halofile oddziałują z komórkami układu odpornościowego człowieka na przykładzie profesjonalnych komórek prezentujących antygeny (komórki dendrytyczne) i limfocytów T. Do tej pory znaczenie archeonów halofilnych jako składnika mikrobiomu człowieka jest bardzo słabo poznane. Dlatego w przyszłości chciałabym skupić się na poznaniu archeonów halofilnych jako stymulatorów odpowiedzi odpornościowej wykorzystując dobrze opracowany model

komórek dendrytycznych pochodzenia monocytarnego. W dalszej perspektywie, po zakończeniu procedur związanych z uzyskaniem stopnia doktora habilitowanego, planuję wystąpić z projektem badawczym, w którym planuję sprawdzić korzystne działanie różnych szczepów archeonów halofilnych w modelu reakcji zapalnej towarzyszącej chorym z astmą i mukowiscydozą. Wybór tych dwóch jednostek chorobowych podyktowany jest faktem, iż jedną z terapii zalecanych w leczeniu tych chorób jest haloterapia, która podawana jest w formie inhalacji solankowych, a zatem środowiska niezwykle podobnego do tego, które zamieszkują halofilne archeony. Powyższy temat stanowi element rozprawy doktorskiej mgr Krzysztofa Krawczyka z Uniwersytetu Łódzkiego, której jestem opiekunem naukowym, oraz podstawą zakwalifikowanego do finansowania projektu badawczego „Preludium 14” finansowanego przez NCN. Pierwsze wyniki badań wstępnych zostały zaprezentowane w postaci doniesień konferencyjnych na konferencjach krajowych i międzynarodowych [**doniesienie konferencyjne Ł.2.a.38, 40, 41, 44 48,49; Ł.2.b.20**].

Podsumowanie dorobku publikacyjnego

Publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe w formie monotematycznego cyklu publikacji	Liczba publikacji	Punkty MNiSW*	IF*
	10 publikacji	190	16,463
Autorstwo lub współautorstwo publikacji naukowych (bez publikacji włączonych do osiągnięcia naukowego) w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR)			
A Przed uzyskaniem stopnia doktora	2 publikacje	30	0,793
B Po uzyskaniu stopnia doktora	21 publikacji	460	42,156
Łącznie	23 publikacje	490	42,949
Autorstwo lub współautorstwo monografii, publikacji naukowych w czasopismach międzynarodowych lub krajowych, nieuwzględnionych na liście Journal Citation Reports (JCR)			
A Przed uzyskaniem stopnia doktora	-	-	-
B Po uzyskaniu stopnia doktora	13 publikacji	33	-
Łącznie	13 publikacji	33	-
Liczba publikacji	RAZEM 46 publikacji	713	59,412
Liczba cytowań (Web of Science) z dnia 31.07.2018	<u>128</u>		
Liczba cytowań bez autocytowań (Web of Science) z dnia 31.07.2018	113		
Liczba cytowań osiągnięcia naukowego	<u>20</u>		
Index Hirscha	<u>7</u>		
Liczba projektów badawczych (w 1-Kierownik, w 10-wykonawca, w 1-opiekun)	<u>12</u>		
Liczba zgłoszeń patentowych	2		
Doniesienia konferencyjne międzynarodowe (3 przed doktoratem, 20 po doktoracie)	<u>83</u>		
krajowe (11 przed doktoratem, 49 po doktoracie)	23		
	60		

*IF i punkty MNiSW podane zgodnie z rokiem ukazania się publikacji

M. Kawalec - Kulbat

Łódź, 31.07.2018