

Małgorzata Bzowska

Wydział Biochemii, Biofizyki i
Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński

Autoreferat

Opis dorobku i osiągnięć
naukowych

Kraków, 2019

1 Imię i nazwisko: Małgorzata Bzowska**2 Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.**

1993	Dyplom magistra biologii ze specjalnością biologia molekularna uzyskany na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie
1998	Stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii uzyskany na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie na podstawie dysertacji pt. „Rola fenotypu i cytokin produkowanych przez monocyty w regulacji produkcji IFN- γ w hodowlach limfocytów T człowieka” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Juliusza Pryjmy

3 Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

1994 - 1995	Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, Polsko-Amerykański Instytut Pediatrii, Zakład Immunologii Klinicznej i Mikrobiologii, stanowisko: asystent lecznictwa
1995 - 2002	Uniwersytet Jagielloński w Krakowie, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Instytut Biologii Molekularnej, Zakład Immunologii, stanowisko: asystent
2002 - 2012	Uniwersytet Jagielloński w Krakowie, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Zakład Immunologii, stanowisko: adiunkt, nauczyciel mianowany
2012 - 2013	Uniwersytet Jagielloński w Krakowie, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Zakład Immunologii, stanowisko: adiunkt, umowa o pracę
2013- obecnie	Uniwersytet Jagielloński w Krakowie, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Zakład Immunologii, stanowisko: starszy wykładowca

4 Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 r. poz. 1789):**4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego**

Zgodnie z treścią w/w ustawy, osiągnięciem naukowym, dołączonym do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego, jest cykl prac powiązanych tematycznie, objętych wspólnym tytułem: **Rozpoznanie wzoru molekularnego przez monocyty i makrofagi - badania odpowiedzi profesjonalnych fagocytów na wybrane antygeny cząsteczkowe lub ich składniki.**

Cykl obejmuje pięć prac oryginalnych. Sumaryczny IF oraz sumaryczna liczba punktów MNiSW₂₀₁₇ dla czasopism, w których zostały opublikowane wspomniane wyżej publikacje wynosi odpowiednio **22.203** oraz **160**. Sumaryczna liczba cytacji dla tych publikacji wynosi **108** (w tym **4** autocytacje). Oświadczenia o moim indywidualnym wkładzie w powstanie tych publikacji znajdują się w Załączniku nr 5. Oświadczenia pozostałych współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich, znajdują się w Załączniku nr 6.

Wartości współczynników oddziaływania IF podane zostały wg danych z bazy Journal of Citation Reports (JRC) dla roku, w którym ukazały się artykuły z moim współautorstwem. Liczba punktów Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW₂₀₁₇) dla wymienionych czasopism została podana na podstawie załączników do komunikatu MNiSW z dnia 25.01.2017 <http://www.bip.nauka.gov.pl/wykaz-czasopism-naukowych/komunikat-w-sprawie-wykazu-czasopism-naukowych-wraz-z-liczba-punktow-przyznanych-za-publicacje-naukowe-w-tych-czasopismach-ustalony-na-podstawie-wykazow-ogloszonych-w-latach-2013-2016.html>.

Liczbę cytowań wymienionych publikacji podano według danych z bazy Web of Science odczytanych w dniu 02.04.2019 r. (AUTHOR: Bzowska M).

4.2 Autorzy, tytuł publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy.

Bzowska M, Guzik K, Barczyk K, Ernst M, Flad HD, Pryjma J. Increased IL-10 production during spontaneous apoptosis of monocytes. *European Journal of Immunology* **2002** Jul;32(7):2011-20.

IF₂₀₀₂ = 4.832 MNiSW₂₀₁₇ = 35 Liczba cytacji = 36

Guzik K, **Bzowska M**, Smagur J, Krupa O, Sieprawska M, Travis J, Potempa J. A new insight into phagocytosis of apoptotic cells: proteolytic enzymes divert the recognition and clearance of polymorphonuclear leukocytes by macrophages. *Cell Death & Differentiation* **2007** Jan;14(1):171-82.

IF₂₀₀₇ = 8.254 MNiSW₂₀₁₇ = 40 Liczba cytacji = 40

Bzowska M, Hamczyk M, Skalniak A, Guzik K. Rapid decrease of CD16 (FcγRIII) expression on heat-shocked neutrophils and their recognition by macrophages. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2011** 2011:284759.

IF₂₀₁₁ = 2.436 MNiSW₂₀₁₇ = 30 Liczba cytacji = 9

Bzowska M, Nogiec A, Skrzeczyńska-Moncznik J, Mickowska B, Guzik K, Pryjma J. Oxidized LDLs inhibit TLR-induced IL-10 production by monocytes: a new aspect of pathogen-accelerated atherosclerosis. *Inflammation* **2012** Aug;35(4):1567-84.

IF₂₀₁₂ = 2.457 MNiSW₂₀₁₇ = 20 Liczba cytacji = 16

Bzowska M, Nogiec A, Bania K, Zygmunt M, Zarębski M, Dobrucki J, Guzik K. Involvement of cell surface 90 kDa heat shock protein (HSP90) in pattern recognition by human monocyte-derived macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* **2017** Sep;102(3):763-774.

IF₂₀₁₇ = 4.018MNI₂₀₁₇ = 35

Liczba cytacji = 7

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

4.3.1 Cel badań

Od czerwca 1998 roku, kiedy to jako asystent naukowo-dydaktyczny zatrudniony w Zakładzie Immunologii Instytutu Biologii Molekularnej UJ (teraz Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ) uzyskałam stopień doktora nauk biologicznych prowadzę wielokierunkowe badania dotyczące różnorodnych aspektów funkcjonowania komórek zaliczanych do profesjonalnych fagocytów – monocytów i makrofagów. Modelem badawczym w mojej pracy są komórki pierwotne izolowane z krwi obwodowej człowieka – monocyty oraz wyprowadzane z nich, w warunkach *in vitro*, makrofagi – hMDM (ang. *human monocyte-derived macrophage*). Monocyty, makrofagi oraz komórki dendrytyczne tworzą system fagocytów jednojądrzastych kluczowy dla ciągłego patrolowania przestrzeni zewnątrzkomórkowej i inicjowania adekwatnej reakcji układu odpornościowego. Ponieważ przebieg procesu fagocytozy wpływa na to czy skutki odpowiedzi immunologicznej okażą się ochronne czy szkodliwe dla organizmu badania przepływu informacji od rozpoznania pochłanianego obiektu do odpowiedzi fagocyta są jednym z centralnych problemów immunobiologii. Moja praca badawcza miała charakter badań podstawowych, a opublikowane wyniki wniosły wkład w wiedzę o mechanizmach oraz konsekwencjach rozpoznania wzorów molekularnych przez ludzkie monocyty oraz makrofagi. Spośród szeregu publikacji z moim współautorstwem wybrałam pięć prac powiązanych tematycznie i stanowiących osiągnięcie naukowe przedstawione we wnioskowanym postępowaniu habilitacyjnym. W wybranych publikacjach jestem pierwszym, ewentualnie drugim (jedna praca) autorem, co poparte załączonymi oświadczeniami o indywidualnym wkładzie autorów publikacji potwierdza moją wiodącą rolę w ich powstaniu.

Prowadzone badania realizowane były w kilku obszarach:

1. Rozpoznanie wzoru molekularnego przez monocyty krwi obwodowej człowieka.
2. Rozpoznanie wzoru molekularnego obecnego na neutrofilach przez ludzkie makrofagi wyprowadzane z monocytów
3. Komponenty kompleksów receptorowych tworzących się w błonie monocytów/makrofagów podczas rozpoznania wybranych wzorów molekularnych.

Głównymi celami naukowymi badań opisanych w prezentowanym cyklu prac było:

- Określenie czy monocyty krwi obwodowej rozpoznają komórki apoptotyczne oraz jakie są konsekwencje takiego rozpoznania.
- Analiza mechanizmu i skutków interferencji utlenionych lipoprotein o niskiej gęstości (oxLDL) z rozpoznaniem ligandów TLR przez monocyty krwi obwodowej.
- Zbadanie wpływu proteolitycznego mikrośrodowiska w miejscu infekcji oraz czynników stresogennych związanych z zapaleniem (podniesiona temperatura ciała) na wzór molekularny powierzchni neutrofilii oraz określenie jaki wpływ na rozpoznanie neutrofilii przez makrofagi mają te modyfikacje.
- Kompleksowa analiza ekspresji białka HSP90 na powierzchni ludzkich pierwotnych monocytów i wyprowadzanych z nich makrofagów oraz określenie funkcji tego białka w rozpoznaniu wzorów molekularnych przez fagocyty jednojądrzaste.

4.3.2 Wprowadzenie do tematyki badań

Jednym z fundamentów układu odpornościowego człowieka są monocyty i makrofagi, które ze względu na wysoką efektywność fagocytozy zaliczane są wraz z neutrofilami, komórkami dendrytycznymi, eozynofilami i bazofilami do grupy profesjonalnych fagocytów (Rabinovitch et al. 1995). Makrofagi to heterogenna populacja komórek obecna we wszystkich tkankach. Podczas rozwoju płodowego komórki te rozwijają się z prekursorów pochodzących z ciała żółtego, wątroby płodowej i śledziony i tworzą pulę rezydentnych makrofagów tkankowych utrzymującą się w wielu organach przez całe życie i odnawiającą się poprzez proliferację (Ginhoux et al. 2016). Po urodzeniu ze szpiku kostnego do krążenia uwalniane są prekursory makrofagów - monocyty, które mogą zastępować rezydentne makrofagi tkankowe oraz zasilać pulę komórek mieloidalnych podczas zapalenia i infekcji. Wyjątkowe znaczenie monocytów i makrofagów w układzie odpornościowym wynika z faktu, że komórki te łączą w sobie zdolność do prymitywnej, natychmiastowej reakcji – fagocytozy, z funkcją koordynacyjną (wydzielanie cytokin, metabolitów kwasu arachidonowego, enzymów, prezentacja antygeny), od której w dużym stopniu zależy prawidłowa odpowiedź całego układu odpornościowego. Te pozornie odrębne sfery aktywności biologicznej w komórkach linii monocyt/makrofag bardzo silnie się przeplatają.

W pewnym uproszczeniu można stwierdzić, że istnieją dwa typy cząsteczek pochłanianych przez fagocyty – zmienione (np. apoptotyczne) komórki własne oraz mikroorganizmy czyli obiekty obce, a ich pochłanianie ma odpowiednio przeciw- lub pro-zapalne konsekwencje. W rzeczywistości jednak przed profesjonalnymi fagocytami stoi zadanie znacznie trudniejsze: rozróżnienie nie tylko pomiędzy komórką żywą a starzejącą się, ale także identyfikacja rodzaju i w pewnym sensie przyczyny śmierci, rozróżnienie pomiędzy komórką zainfekowaną i niezainfekowaną, pomiędzy

patogendem i drobnoustrojem komensalnym czy wreszcie pomiędzy różnymi klasami mikroorganizmów. Monocyty i makrofagi wyposażone są w niezwykle złożony system rozpoznania struktur obecnych na powierzchni pochłanianego obiektu, które określane są wspólnym mianem – molekularny wzór powierzchni. Podczas ewolucji fagocyty stopniowo komplikowały mechanizmy rozpoznania molekularnego wzoru powierzchni osiągając zdolność do odróżnienia patogenów (wzory molekularne związane z patogenami – PAMP, ang. *Pathogen-Associated Molecular Pattern*), komórek apoptotycznych (wzory molekularne związane z komórkami apoptotycznymi - ACAMP, ang. *Apoptotic Cell-Associated Molecular Pattern*), komórek uszkodzonych, niezainfekowanych (wzory molekularne związane z komórkami uszkodzonymi – DAMP, ang. *Damage-Associated Molecular Pattern*) oraz funkcjonalnych komórek własnych. Molekularny wzór powierzchni rozpoznawany jest przez liczną, heterogenną grupę receptorów określanych jako receptory dla wzorów molekularnych – PRR (ang. *Pattern Recognition Receptors*). Zaliczamy do nich zarówno receptory wydzielnicze (zewnątrzkomórkowe), które funkcjonują jako opsoniny (kolektyny i pentraksyny), receptory powierzchniowe uczestniczące w fagocytozie (receptory lektynowe i receptory zmiatacze – SR, ang. *Scavenger Receptor*) oraz powierzchniowe lub cytoplazmatyczne, których nadrzędną rolą jest aktywacja komórki. Do tych ostatnich zaliczamy między innymi receptory Toll-podobne – TLR (ang. *Toll-like receptor*) inicjujące po związaniu ligandu złożoną kaskadę przekazu sygnału, której rezultatem jest indukcja produkcji cytokin prozapalnych takich jak TNF, IL-1 β , IL-6, IL-12, ale również uruchomienie mechanizmów kontrolnych, czego przykładem jest produkcja cytokiny przeciwzapalnej - IL-10. Receptory TLR zlokalizowane są zarówno na powierzchni komórki jak i wewnątrzkomórkowo w błonie endosomów. Ligandy receptorów TLR to lipopolisacharydy, peptydoglikany, lipopetydy, glikolipidy czy mannany budujące ściany komórkowe bakterii i grzybów, ale także niemetylowane sekwencje CpG czy dwu- i jednoniciowe RNA. Większość receptorów TLR funkcjonuje w postaci homodimerów, rzadziej w postaci heterodimerów, jak na przykład receptor TLR2, który dimeryzuje z receptorem TLR1 lub TLR6 i w zależności od partnera dimeryzacji rozpoznaje odpowiednio triacylowane lub diacylowane lipopeptydy (Takeda et al. 2005).

W zdrowym organizmie wielokomórkowym większość aktywności fagocytarnej jest skierowana przeciwko własnym komórkom. Fagocyty muszą stale rozpoznawać i skutecznie usuwać miliardy martwych komórek, które powstają zarówno w trakcie rozwoju i utrzymywania homeostazy organizmu jak również podczas stresu, uszkodzeń, infekcji, stanów zapalnych i odpowiedzi immunologicznej. Ten rodzaj fagocytozy, określany jako eferocytoza nie jest wyłącznie biernym usuwaniem ciał martwych komórek, ale precyzyjnie kontrolowanym procesem zaprojektowanym tak, aby skutecznie eliminując umierające komórki, ograniczyć narażenie na ich potencjalnie szkodliwe składniki, zinterpretować informację o rodzaju i okolicznościach śmierci oraz włączyć

mechanizmy regulacyjne, których celem jest m.in. wygaszenie zapalenia i utrzymanie tolerancji immunologicznej (Henson i Bratton 2009). Mechanizmy rozpoznania komórek apoptotycznych są dość dobrze poznane (Penberthy i Ravichandran 2016). Wiadomo, że komórki fagocytyzujące rozpoznają komórki apoptotyczne w oparciu o brak sygnałów odpychających, klasyfikowanych jako „nie jedz mnie” (ang. *'do not eat me'*), takich jak CD31 czy CD47 oraz zestaw specyficznych cech pojawiających się na powierzchni komórek umierających zwany wzorem ACAMP lub sygnałami „zjedz mnie” (ang. *'eat me'*) (Grimsley i Ravichandran 2003, Lauber et al. 2004). Jedną z podstawowych cech, która pojawia się już na wczesnych etapach apoptozy jest utrata asymetrii błony komórkowej i ekspozycja fosfatydyloseryny (PtdSer) w zewnętrznej monowarstwie lipidów. Odsłonięte reszty PtdSer rozpoznawane są albo bezpośrednio poprzez receptory błonowe, takie jak receptor TIM4 (ang. *T-cell immunoglobulin mucin receptor 4*), BAI1 (ang. *brain-specific angiogenesis inhibitor 1*) oraz stabilina-2 lub pośrednio poprzez wiążące się do PtdSer cząsteczki mostkujące, takie jak MFG-E8 (ang. *milk fat globule-EGF factor 8*) oraz Gas6, a następnie receptory dla tych opsonin: integryny $\alpha\beta 3$ i $\alpha\beta 5$ lub rodzina receptorów TAM – Tyro3, Axl, Mer-TK (Rothlin i Lemke 2010). W błonach komórek apoptotycznych pojawiają się również inne cząsteczki, które w komórce żywej występują wewnątrz lub po stronie cytozolowej błony komórkowej. Do tego typu cząsteczek należą Aneksyna I i Aneksyna II czy endoplazmatyczne białko - kalretikulina (Erwig i Henson 2007). W zależności od typu komórki sygnałem „zjedz mnie” mogą być również: ICAM-3 rozpoznawany przez receptor CD14 na fagocycie, zmodyfikowane glikoproteiny wiązane przez receptory lektynowe, utlenione fosfolipidy błony rozpoznawane przez receptory zmiatacze czy inne, nieokreślone jeszcze miejsca, wiążące kolektyny, białka dopełniacza C1q lub C3b czy trombospondynę. W takich przypadkach w rozpoznaniu komórki apoptotycznej uczestniczyć będą receptory dla składników dopełniacza CD11b/CD18 i CD11c/CD18, integryny $\alpha\beta 5$ oraz kompleksy integryn $\alpha\beta 3$ i CD36 czy CD91. Większość opisanych do tej pory sygnałów „nie jedz mnie” i „zjedz mnie” dotyczy rozpoznania komórek umierających na drodze apoptozy, jednak wraz z opisywanymi w literaturze kolejnymi typami regulowanej śmierci komórki jasnym staje się, że część zidentyfikowanych do tej pory wzorów powierzchni wykorzystywana jest również w rozpoznaniu komórek umierających na drodze np. nekroptozy czy pyroptozy.

Jednym z typów komórek, które stanowią częsty obiekt rozpoznawany i pochłaniany przez makrofagi są neutrofile, inaczej granulocyty obojętnochłonne – PMN (ang. *Polymorphonuclear cells*). Komórki te, również zaliczane do profesjonalnych fagocytów, są najliczniejszą populacją leukocytów krwi obwodowej człowieka, charakteryzującą się dużą aktywnością fagocytarną i wysokim potencjałem bakteriobójczym. PMN wykazują niską aktywność transkrypcyjną i translacyjną, a większość substancji, które niezbędne są do wykonania zadań stojących przed nimi

zmagazynowanych jest w gotowej postaci w licznych ziarnistościach cytoplazmatycznych. Taki stan pozwala im na natychmiastową odpowiedź na sygnały aktywujące, dzięki czemu komórki te stanowią tzw. pierwszą linię obrony antybakteryjnej w organizmie (Flannagan et al. 2012). Krytyczne zatem jest, aby krążąca i patrolująca tkanki pula tych komórek była zawsze w pełni funkcjonalna i gotowa do pochłonięcia i zabicia infekujących patogenów. U ludzi ten stan ciągłej gotowości uzyskiwany jest przez ciągle dostarczanie świeżych PMN uwalnianych ze szpiku kostnego do krążenia z tempem około 10 milionów komórek w ciągu minuty. Jednocześnie PMN są jednymi z najkrócej żyjących komórek i w warunkach homeostazy umierające neutrofile usuwane są z krążenia poprzez system fagocytów jednojądrzastych w śledzionie i szpiku kostnym (Gordon et al. 2015). W sytuacji stanu zapalnego PMN pod wpływem czynników chemotaktycznych migrują do tkanek, aby wypełnić swoje funkcje. W miejscach stanu zapalnego liczba PMN może być ekstremalnie wysoka, nie tylko skutkiem kierunkowego nacieku z krążenia, ale również w związku z opóźnieniem przez czynniki zapalne obecne w miejscu infekcji konstytutywnej apoptozy tych komórek. Monocyty, makrofagi i neutrofile współpracują w regulacji procesu zapalnego i odpowiedzi immunologicznej – rezydentne makrofagi tkankowe wydzielając substancje chemotaktyczne rekrutują PMN do tkanek, neutrofile indukują kolejną falę napływu komórek, tym razem monocytów, które różnicują w makrofagi zapalne. Po usunięciu patogenu, w fazie wygaszania zapalenia zadaniem makrofagów tkankowych jest, w celu ochrony integralności tkanek, usunięcie martwych neutrofilii, co staje się jednocześnie przyczynkiem do uwolnienia sygnałów przeciwzapalnych oraz wspomagających gojenie i regenerację.

W ciągu dwu ostatnich dekad stawało się jasne, że analiza pojedynczych oddziaływań ligand-receptor pomiędzy fagocytym a pochłanianą cząstką prowadzi w ślepy zaułek. Mechanizm rozpoznawania wzoru skonstruowany jest na zasadzie modalności i redundancji, a komórka fagocytująca zdolna jest do wytworzenia unikatowego złącza pomiędzy błoną fagocytu, a pochłanianym obiektem, zwanego synapsą pochłaniania (Lauber et al. 2004, Stuart i Ezekowitz 2005). Złożoność synapsy skutkuje niezwykłą odpornością systemu internalizacji, który w całości nie może zostać łatwo zablokowany czy wyłączony, ale z drugiej strony powoduje, że nawet subtelne zmiany w składzie synapsy mogą skutkować zasadniczą zmianą sensu rozpoznania, a co za tym idzie modyfikacją skutków fizjologicznych (Stuart i Ezekowitz 2005, Triantafilou et al. 2011).

4.3.3 Badania rozpoznania wzoru molekularnego przez monocyty krwi obwodowej człowieka

Bzowska M, Guzik K, Barczyk K, Ernst M, Flad HD, Pryjma J. Increased IL-10 production during spontaneous apoptosis of monocytes. *European Journal of Immunology* **2002** Jul;32(7):2011-20.

Bzowska M, Nogiec A, Skrzeczyńska-Moncznik J, Mickowska B, Guzik K, Pryjma J. Oxidized LDLs inhibit TLR-induced IL-10 production by monocytes: a new aspect of pathogen-accelerated atherosclerosis. *Inflammation* **2012** Aug;35(4):1567-84.

W czasie kiedy opisano zjawisko fagocytozy komórek ulegających apoptozie wydawało się, że brak odpowiedzi zapalnej zależy wyłącznie od szybkiej eliminacji komórek umierających. Następnie jednak zaczęły pojawiać się dowody, że fagocytoza komórek apoptotycznych wpływa na funkcje fagocytów. Pokazano m.in., że pochłanianie apoptotycznych neutrofilów przez makrofagi skutkuje zwiększoną produkcją cytokiny przeciwzapalnej TGF β , co z kolei hamuje indukowaną LPS syntezę cytokin prozapalnych (Fadok et al. 1998). W tym czasie jednak, niewiele było wiadomo na temat rozpoznania komórek apoptotycznych przez prekursorów makrofagów obecne w krwi obwodowej czyli monocyty. W trakcie badań prowadzonych w tym okresie zaobserwowałam, że ulegające spontanicznej apoptozie monocyty krwi obwodowej zmieniają profil cytokin produkowanych w odpowiedzi na stymulację LPS – wyraźnie wzrasta produkcja cytokiny przeciwzapalnej - IL-10, przy nie zmienionej sekrecji cytokin prozapalnych, takich jak TNF i IL-1 β . Podniesiona produkcja IL-10, obserwowana zarówno na poziomie mRNA jak i wydzielanego białka, korelowała z pojawianiem się komórek apoptotycznych w hodowli. Zrodziło się zatem pytanie: czy apoptotyczne monocyty produkują większe ilości IL-10, podobnie do opisanej w tym czasie nasilonej sekrecji IL-10 przez apoptotyczne limfocyty (Gao et al. 1998) czy też monocyty rozpoznają komórki apoptotyczne i reagują, podobnie do makrofagów, zmienionym uwalnianiem cytokin? Cytometryczna analiza komórek produkujących IL-10 połączona z detekcją jednego z wczesnych markerów apoptozy - PtdSer w zewnętrznej warstwie błony komórkowej - pozwoliła stwierdzić, że producentem IL-10 są monocyty nie wykazujące cech apoptozy. Dalsze analizy przeprowadzone po sortowaniu komórek udowodniły, że nieapoptotyczne (PtdSer-ujemne) monocyty stymulowane LPS produkują większe ilości IL-10 w wyniku bezpośredniej interakcji z komórkami apoptotycznymi (PtdSer-dodatnimi). Okazało się również, że monocyty stymulowane zarówno LPS, *S.auresu* jak i zymosanem produkują większe ilości IL-10 także w obecności apoptotycznych neutrofilów. Wyniki tych badań opublikowane w 2002 roku (Bzowska et al. 2002) **wyraźnie wskazywały, że monocyty krwi obwodowej rozpoznają komórki apoptotyczne, a konsekwencją takiej interakcji jest zwiększona produkcja cytokiny przeciwzapalnej - IL-10.** W pracy tej pokazaliśmy również, że inaczej niż w monocytach, ekspozycja makrofagów na komórki apoptotyczne nie podnosi syntezy IL-10, co pozostaje w zgodzie z wcześniejszymi doniesieniami Fadok et al. 1998. Sugeruje to, że zdolność monocytów do zwiększonej produkcji IL-10 w obecności apoptotycznych komórek jest tracona podczas różnicowania i zastępowana przez zwiększoną produkcję TGF β . W efekcie końcowym w obu przypadkach sprzyja to wygaszaniu odpowiedzi zapalnej. Wiadomo jest, że TGF β wpływa na monocyty raczej prozapalnie, a wykazuje działanie supresyjne wobec makrofagów. Z kolei IL-10 hamuje wiele funkcji monocytów, włączając w to produkcję cytokin prozapalnych i chemokin, a może być nieefektywna w supresji ludzkich makrofagów i preaktywowanych monocytów. Uzasadnioną

wyduje się więc spekulacja, że IL-10 działać będzie głównie w krążeniu np. podczas sepsy oraz na monocyty napływające do miejsc stanu zapalnego, podczas gdy TGF β w tkankach oraz na późniejszych etapach odpowiedzi zapalnej. W zgodzie z tą spekulacją pozostają wyniki opublikowane przez zespół z naszego zakładu prezentujące zwiększoną produkcję IL-10 przez monocyty krwi obwodowej septycznych noworodków (Skrzeczyńska et al. 2002). Co więcej, w pracy, w której jestem współautorem pokazaliśmy, że subpopulacja monocytów CD14^{high}CD16⁺, której odsetek wzrasta podczas sepsy jest głównym producentem IL-10 (Skrzeczynska-Moncznik et al. 2008) i preferencyjnie asocjuje z apoptocytycznymi neutrofilami (Mikołajczyk et al. 2009).

Jednym z sygnałów „zjedz mnie” obecnych w błonie komórek apoptocytycznych są utlenione fosfolipidy - epitopy podobne do struktur obecnych w cząsteczkach utlenionych lipoprotein o niskiej gęstości (oxLDL). Z tych powodów cząsteczki oxLDL używane są do kompetycyjnego hamowania interakcji pomiędzy fagocytom a komórką apoptocytyczną. Ku naszemu zaskoczeniu, kiedy próbowaliśmy przy pomocy oxLDL hamować oddziaływanie pomiędzy apoptocytycznymi neutrofilami a monocytami zaobserwowaliśmy, że przeciwnie do działania komórek apoptocytycznych obecność utlenionych LDL dramatycznie obniża sekrecję IL-10 przez monocyty stymulowane LPS. Utlenione LDL są klasycznym czynnikiem ryzyka miażdżycy - choroby, która według aktualnych poglądów ma dwojakie podłoże. Zaburzeniu metabolizmu lipidów, prowadzącemu do akumulacji i oksydacyjnych modyfikacji lipoprotein o niskiej gęstości, towarzyszy aktywny proces immunologiczny o charakterze przewlekłego stanu zapalnego, o nie do końca wyjaśnionej etiologii. Istotną rolę na każdym etapie rozwoju miażdżycy pełnią monocyty oraz dojrzewające z nich makrofagi. Jest to dominujący typ komórek w zmienionej chorobowo błonie wewnętrznej tętnicy, mający też największy wpływ na ewolucję blaszki miażdżycowej. Dzięki bogatemu repertuarowi posiadanych receptorów komórki te mogą integrować sygnały płynące od obecnych w blaszce lub krążeniu utlenionych LDL oraz czynników infekcyjnych. W odpowiedzi na te sygnały monocyty i makrofagi produkują szereg rozpuszczalnych mediatorów, które koordynują lokalny stan zapalny. Jednym z takich mediatorów o charakterze przeciwzapalnym i immunomodulującym, wspierającym utrzymanie homeostazy i ochronę organizmu przed negatywnymi skutkami nadmiernej odpowiedzi immunologicznej oraz rozwojem procesów autoimmunizacyjnych jest IL-10. Cytokina ta wpływa również na ograniczenie procesów, które są charakterystyczne dla rozwoju zmian miażdżycowych (Tedgui i Mallat 2006), a monocyty izolowane z krwi chorych charakteryzują się zmniejszoną produkcją IL-10 po stymulacji LPS przy nie zmienionym wydzielaniu TNF (van Haelst et al. 2004). Ochronną rolę IL-10 potwierdzają także badania prowadzone *in vivo* na zwierzętach. U myszy z nokautem genu apolipoproteiny E pozbawionych dodatkowo funkcjonalnego genu IL-10 (ApoE^{-/-} IL-10^{-/-}) znacznie szybciej dochodzi do akumulacji złogów tłuszczowych w ścianie tętnic w porównaniu z myszami ApoE^{-/-}, zwłaszcza kiedy

zwierzęta hodowane są w warunkach niesterylnych, co sugeruje, że w środowisku naturalnym przeciwmiażdżycowa funkcja IL-10 może mieć szczególnie istotne znaczenie (Mallat et al. 1999, Potteaux et al. 2004). Wziąwszy pod uwagę powyższe fakty oraz naszą własną obserwację, że obecność oxLDL podczas stymulacji monocytów LPS znacząco obniża uwalnianie IL-10 do środowiska, postanowiłam bardziej szczegółowo zanalizować interferencję pomiędzy reprezentowanymi w tym przypadku przez utlenione LDL wzorami DAMP a wzorami PAMP (ligandy receptorów TLR), zachodzącą podczas ich rozpoznania przez monocyty. Badania prowadzono głównie dzięki uzyskanemu przeze mnie finansowaniu z MNiSW (N N303 291934 „Udział modyfikowanych lipoprotein o niskiej gęstości w regulacji produkcji IL-10 przez monocyty/ makrofagi” 2008 – 2011). W pracy **Bzowska et al. 2012 pokazaliśmy, że obecność utlenionych LDL dramatycznie obniża produkcję IL-10 przez monocyty krwi obwodowej człowieka stymulowane zarówno ligandami TLR4 (LPS z *E. coli*) jak i TLR2 (Pam2CSK4, Pam3CSK4, LPS z *P. gingivalis*), przy nieznacznej zmianie w uwalnianiu TNF**. Opublikowane w pracy wyniki eksperymentów kinetycznych udowodniły ponadto, że opisana modulacja produkcji cytokin przez oxLDL nie wynika ze zmian kinetyki ich uwalniania, a oxLDL selektywnie hamują odpowiedź przeciwzapalną (sekrecja IL-10) następującą po mniej bardziej zdecydowanej reakcji prozapalnej. Przyjmując proporcję pomiędzy IL-10 i TNF uwalnianymi w kolejnych punktach czasowych w nieobecności oxLDL jako fizjologiczną stwierdziliśmy, że obecność utlenionych LDL bardzo silnie obniża potencjał monocytów do odpowiedzi przeciwzapalnej. Na podkreślenie zasługuje fakt, że opisywana regulacja jest specyficzna dla monocytów i nie zachodzi w makrofagach, co sugeruje, że modyfikowane przez oxLDL prozapalne mikrośrodowisko może powstawać jeszcze zanim monocyty wyróżniają w makrofagi czyli na wczesnych etapach powstawania blaszek miażdżycowych lub na etapach późniejszych przez komórki świeżo naciekające ściany naczyń. Opisana przez nas zmiana w produkcji cytokin jest charakterystyczna dla utlenionych LDL, ponieważ ani natywne LDL, ani lipoproteiny o wysokiej gęstości (HDL), utlenione czy też natywne nie wykazują efektów regulacyjnych w badanym układzie. **Spektakularnie różnicową regulację produkcji IL-10 i TNF przez oxLDL zaobserwowaliśmy w przypadku odpowiedzi monocytów na LPS z *Porphyromas gingivalis* (pgLPS)**. W tym przypadku równolegle z silną supresją IL-10, oxLDL nie hamują produkcji TNF, a nawet ją nieznacznie nasilają. *Porphyromonas gingivalis* jest jednym z czynników etiologicznych w ludzkiej paradontozie, ale dane epidemiologiczne oraz eksperymentalne wspierają pogląd, że chroniczna infekcja tą bakterią sprzyja również tzw. miażdżycy nasilanej patogenami (ang. *pathogen-accelerated atherosclerosis*) (Söder et al. 2005, Desvarieux et al. 2005, Gibson 3rd et al. 2004). Hipoteza miażdżycy nasilanej patogenami postuluje, że okazjonalna obecność PAMP w krwi może promować aktywację komórek śródbłonna i rekrutację monocytów do ścian naczyń. W badaniu epidemiologicznym Bruneck wykazano ponadto, że podniesiony poziom

endotoksyny we krwi u osób zdrowych zwiększa ryzyko rozwoju miażdżycy (Wiedermann et al. 1999), a promiażdżycowy wpływ przypisuje się również szeroko pojętemu całościowemu narażeniu organizmu na różne patogeny (and. *infectious burden*) (Espinola-Klein et al. 2002). **Do czasu ukazania się naszej pracy brak było jednak danych na temat interferencji pomiędzy klasycznym czynnikiem ryzyka miażdżycy - oxLDL – a LPS z *Porphyromonas gingivalis* w procesie rozpoznania wzorów przez monocyty.** Dodatkowo mechanizm rozpoznania LPS z *P. gingivalis* nadal pozostawał nie w pełni wyjaśniony. Dane wskazywały, że odmiennie od wielu innych typów LPS aktywuje on komórki gospodarza przez oba receptory: TLR2 i TLR4, a wynika to prawdopodobnie z heterogenności tej cząsteczki zawierającej różne formy lipidu A (Darveau et al. 2004). Sugerowano również, że lipoproteiny LPS z *P.gingivalis* są podstawowym komponentem rozpoznawanym przez TLR2, natomiast wysoko oczyszczony lipid A jest ligandem dla TLR4 (Hashimoto et al. 2004). Z drugiej strony pokazano, że pgLPS aktywuje ludzkie komórki śródbłonka w sposób zależny od TLR2, ale wymaga to współdziałania z TLR1, CD36 i integryną CD11b/CD18, co z kolei sugeruje, że stymulacja i przekaz sygnału może być procesem komórkowo-specyficznym (Triantafilou et al. 2007). **Na podstawie wyników uzyskanych przez nasz zespół stwierdziliśmy, że w monocytach ludzkiej krwi obwodowej w odpowiedzi na LPS z *P.gingivalis* sekrecja TNF jest zależna zarówno od TLR4 jak i TLR2, natomiast produkcja IL-10 zależy wyłącznie od stymulacji TLR2.** Wynik ten pozostaje w zgodzie z danymi o istnieniu silnego powiązania pomiędzy ekspresją TLR2 na monocytach, a ich zdolnością do produkcji IL-10 (Schaaf et al. 2009). Opisywana w pracy regulacja produkcji cytokin obserwowana była tylko w monocytach adherentnych i nie dotyczyła ani makrofagów, gdzie adhezja jest cechą stałą, ani monocytów hodowanych w warunkach zapobiegających ich adhezji do podłoża. Podejrzewaliśmy zatem, że jakieś dodatkowe oddziaływanie receptor-ligand związane z adhezją komórek może brać udział w systemie rozpoznania pgLPS – TLR2 prowadzącym do produkcji IL-10. Po zastąpieniu surowicy fibronektyną, fibrynogenem lub witronektyną, zaobserwowaliśmy, że spośród badanych białek tylko witronektyna wykazała zależny od stężenia wpływ na produkcję IL-10. Pokazaliśmy ponadto, że preinkubacja monocytów z przeciwciałami agonistycznymi wobec receptorów witronektyny ($\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$, $\beta3$) skutkuje dramatycznym podniesieniem produkcji IL-10 w odpowiedzi na pgLPS. Agonistyczny efekt był również widoczny w hodowlach bez surowicy, co sugeruje z kolei, że kostymulacja poprzez receptor TLR2 oraz integryny $\beta3$ i $\beta5$ prowadzi do zwiększonej produkcji IL-10. Inną badaną integryną, również związaną z adhezją monocytów do podłoża był receptor CD11b. Pokazaliśmy, że niektóre ligandy (GlcNac) lub antagoniści (przeciwciało monoklonalne klon: Vim12) integryny CD11b również regulują produkcję IL-10 indukowaną przez ligandy TLR2. Co ciekawe inne ligandy CD11b - ICAM-1 oraz fibrynogen – nie wykazały efektu regulującego sekrecję IL-10. Wyniki te sugerują, że CD11b

zaangażowany jest w ten proces raczej poprzez interakcje lateralne z innymi receptorami niż poprzez bezpośrednie wiązanie witronektyny czy innych surowiczych cząsteczek dodatkowych. Już wcześniej wiadomo było, że w błonie fagocytów podczas stymulacji receptory TLR2 oraz TLR4 tworzą wraz z wieloma innymi cząsteczkami m.in. z CD11b/CD18 funkcjonalne kompleksy receptorowe (Triantafilou et al. 2007). Za najbardziej prawdopodobne miejsce takich interakcji uznaje się bogate w cholesterol tratwy lipidowe zawierające zestawy receptorów PRR oraz innych białek powierzchniowych (Triantafilou et al. 2011). W naszej pracy pokazaliśmy, że sekwestracja cholesterolu i niszczenie struktury tratw lipidowych poprzez traktowanie monocytów metyl- β -cyklodekstryną skutkuje znaczącym obniżeniem produkcji IL-10 w odpowiedzi na pGLPS, podczas gdy sekrecja TNF wydaje się być niezależna od tratw receptorowych, podobnie jak uwalnianie obu cytokin w odpowiedzi na stymulację receptora TLR4. **Wnioskujemy, że podczas stymulacji monocytów przez LPS z *P.gingivalis* interakcja TLR2, receptora witronektyny i integryny CD11b w tratwie receptorowej jest warunkiem optymalnej indukcji produkcji IL-10, a receptor witronektyny wydaje się być głównym celem hamującego działania utlenionych fosfolipidów na produkcję IL-10. W oparciu o nasze wyniki sugerujemy, że potencjał do przeciwzapalnej odpowiedzi monocytów hamowany jest w środowisku bogatym w utlenione LDL, sprzyjając rozwojowi chronicznego zapalenia. W tym kontekście zaburzone rozpoznanie PAMP przez monocyty w obecności oxLDL może być zaproponowane jako nowy ogólny patomechanizm miażdżycy nasilanej patogenami.**

4.3.4 Badania rozpoznania wzoru molekularnego obecnego na neutrofilach przez ludzkie makrofagi wprowadzane z monocytów

Guzik K, Bzowska M, Smagur J, Krupa O, Sieprawska M, Travis J, Potempa J. A new insight into phagocytosis of apoptotic cells: proteolytic enzymes divert the recognition and clearance of polymorphonuclear leukocytes by macrophages. *Cell Death and Differentiation* 2007 Jan;14(1):171-82.

Bzowska M, Hamczyk M, Skalniak A, Guzik K. Rapid decrease of CD16 (Fc γ RIII) expression on heat-shocked neutrophils and their recognition by macrophages. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011 2011:284759.

Neutrofile (PMN) stanowią pierwszą linię obrony przeciwbakteryjnej w organizmie i naciekają w dużych ilościach do miejsc infekcji i rozwijającego się stanu zapalnego. Ewidentnie ma to miejsce w przypadku chorób zapalnych dziąseł, gdzie nawet w minimalnie zapalnym nacieku obserwuje się akumulację rzędu 2.5×10^7 PMN/ml (Miyasaki et al. 1991). PMN stanowią w takim miejscu najważniejszą ochronę przeciw bakteriom obecnym w płytce nazębnej i nawet bardzo niewielka ich dysfunkcja może predysponować do ciężkich form paradontozy (Deas et al. 2003). Z drugiej strony dobrze udokumentowany jest również fakt, że uszkodzenie tkanek związane z paradontozą związane jest z intensywną akumulacją PMN i uwalnianiem ich zawartości np. enzymów

hydrolitycznych (Kantarci et al. 2003). W pracy Guzik et al. z 2007 roku postanowiliśmy przeanalizować zmiany wzoru molekularnego na neutrofilach traktowanych enzymami proteolitycznymi gospodarza (katepsyna G) lub pochodzenia bakteryjnego (gingipainy R z *Porphyromonas gingivalis*) i ich konsekwencje dla rozpoznania przez ludzkie makrofagi wyprowadzane z monocytów. Stwierdziliśmy, że podczas gdy traktowanie apoptotycznych komórek katepsyną G niemal całkowicie hamuje ich pochłanianie przez makrofagi, enzymy proteolityczne produkowane przez bakterie *Porphyromonas gingivalis* (gingipainy R) znacząco ją nasilają. Co jeszcze bardziej interesujące gingipainy R powodowały, że również świeżo-izolowane, w pełni funkcjonalne PMN, które normalnie nie są pochłaniane przez makrofagi podlegały bardzo intensywnej fagocytozie. Opisane wcześniej dane na temat mechanizmów rozpoznania komórek apoptotycznych przez makrofagi podkreślają, że do efektywnego pochłaniania konieczna jest interakcja odpowiednich receptorów na fagocytozie z PtdSer pojawiającą się w zewnętrznej warstwie błony komórki fagocytowanej (Hoffmann et al. 2001). Stwierdziliśmy jednak, że gingipainy R nie wpływają na proces apoptozy PMN i indukcja pochłaniania żywych oraz nasilenie pochłaniania apoptotycznych neutrofilów nie są związane z pojawianiem się na ich powierzchni jednego z kluczowych sygnałów „zjedz mnie” – fosfatydyloseryny, natomiast przynajmniej częściowo zależy od proteolitycznego cięcia cząsteczki CD31 (PECAM-1 ang. *Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1*), zaliczanej do sygnałów „nie jedz mnie”. **Ważnym aspektem wyników opublikowanych w naszej pracy jest fakt, że obecność fosfatydyloseryny na powierzchni neutrofilów nie jest absolutnie konieczna do pochłaniania tych komórek przez ludzkie makrofagi.** Wniosek ten oparliśmy o dwie równoległe obserwacje: preinkubacja apoptotycznych PMN z katepsyną G całkowicie eliminowała ich pochłanianie bez wpływu na ekspozycję PtdSer, a świeżo-izolowane, żywe PMN eksponowane na proteazy pochodzenia bakteryjnego gingipainy R były bardzo wydajnie pochłaniane, mimo braku znaczącej ekspozycji PtdSer lub indukcji zmian o charakterze nekrotycznym. Zaznaczyć należy, że w obu przypadkach obserwowany efekt był całkowicie zależny od proteolitycznej aktywności enzymów, co z kolei wyraźnie sugeruje udział proteolitycznych modyfikacji powierzchni neutrofilów w obserwowanym zjawisku. **Na podstawie uzyskanych wyników, możemy stwierdzić, że sygnały „zjedz mnie” generowane na neutrofilach traktowanych enzymami proteolitycznymi są ligandami o charakterze białkowym, które rozpoznawane są przez receptory obecne na makrofagach.** Nadal jednak nie wiemy jakie to ligandy. Wykonane analizy pozwalają stwierdzić, że celem działania enzymów proteolitycznych nie jest ani ICAM-3 ani Aneksyna I - ligandy białkowe, których zaangażowanie w usuwanie komórek apoptotycznych jest udowodnione. Co więcej klasyczne analizy blokowania fagocytozy neutrofilów przez makrofagi przy pomocy przeciwciał blokujących oraz ligandów kompetycyjnych wyraźnie wskazują, że generowany przez gingipainy R ligand nie jest

rozpoznawany ani przez CD14, ani CD91 ani składniki kompleksu $\alpha\beta3/CD36$ /trombospondyna. Udział białek mostkujących (białka surowicy czy opsoniny uwalniane przez makrofagi) został również wykluczony, ponieważ w układzie eksperymentalnym wymieniano medium interakcyjne na świeże oraz te same wyniki uzyskiwano w i bez obecności surowicy. Jedną z kluczowych konsekwencji fagocytozy apoptotycznych komórek przez makrofagi jest hamowanie produkcji czynników zapalnych, w tym TNF. Sugeruje się, że również w tym procesie oddziaływanie pomiędzy PtdSer i jej specyficznym receptorem/ami na makrofagach stanowi warunek wstępny dla indukcji odpowiedzi antyzapalnej. Dane opublikowane przez nas argumentują jednak przeciwko takiemu przekonaniu. **Pochłanianie traktowanych gingipainami R żywych, nie wykazujących ekspozycji PtdSer neutrofilii ma ten sam przeciwzapalny skutek jak fagocytoza komórek apoptotycznych. Interakcja ligandu białkowego z receptorem na fagocycie jest najwyraźniej wystarczająca do związania PMN z makrofagiem, powodując nie tylko jest fagocytozę, ale również indukcję odpowiedzi przeciwzapalnej.** Tak więc, pod wieloma względami zależne od białkowego ligandu usuwanie PMN opisane w naszej pracy różni się od usuwania komórek apoptotycznych. Nie wykluczone więc, że kiedy PMN znajdują się w mikrośrodowisku bogatym w enzymy proteolityczne zdolne do upłynniania tkanek miękkich włączony zostaje specjalny, nieredundantny mechanizm ich pochłaniania, zapewniający efektywne usuwanie starzejących się PMN, jeszcze zanim dojdzie do uszkodzenia błony i uwolnienia potencjalnie szkodliwej, proteolitycznej zawartości tych komórek. Jak wspomniano wcześniej zaburzenia usuwania komórek apoptotycznych mogą mieć negatywne konsekwencje takie jak np. rozwój systemowych chorób autoimmunologicznych. Z kolei nieprawidłowości w indukcji odpowiedzi przeciwzapalnej mogą nasilać chroniczne stany zapalne takie jak reumatoidalne zapalenie stawów, rozstrzenie oskrzeli niezwiązane z mukowiscydozą czy zwłóknienie torbielowate. Pokazano, że w chorobach płuc za akumulację martwych PMN zdają się być odpowiedzialne, zależne od elastazy i katepsyny G, zaburzenia fagocytozy PMN przez makrofagi płucne. Mechanizm w jaki katepsyna G utrudnia pochłanianie komórek umierających jest nieznan, natomiast elastaza odpowiedzialna jest za ścinanie z powierzchni makrofagów receptora dla PtdSer (Vandivier et al. 2002). Nie wykluczone więc, że opisana przez nas degradacja sygnału „zjedz mnie” - PtdSer - na apoptotycznych neutrofilach przez katepsynę G może również w jakimś stopniu przyczyniać się do retencji komórek apoptotycznych w płucach, a podobny scenariusz może zachodzić również w przebiegu paradontozy. W świetle naszych wyników, w tym miejscu zapalny sytuacja jest dodatkowo komplikowana poprzez znakowanie żywych, funkcjonalnych PMN do usuwania poprzez cięcie sygnału odpychającego „nie jedz mnie” - CD31 i generację nowego sygnału „zjedz nie” przez gingipainy R obecne w mikrośrodowisku. Z jednej strony może to prowadzić do obniżania liczby funkcjonalnych neutrofilii i sprzyjać kolonizacji tkanek przez *Porphyromonas gingivalis*, a z drugiej,

kiedy w środowisku pojawią się enzymy proteolityczne uwalniane z neutrofilii, mechanizmy wygaszania zapalenia nie będą działać w pełni funkcjonalnie, a nieefektywnie usuwane komórki apoptotyczne będą podlegać wtórnej nekrozie, tym samym napędzając dalsze zapalenie. Taki scenariusz dobrze pasuje do klinicznego obrazu przebiegu paradontozy u dorosłych, gdzie w wysiękach z dziąseł obserwowany jest, razem z dużą ilością nekrotycznych neutrofilii, wysoki poziom aktywności proteolitycznej pochodzenia zarówno z PMN jak i *Porphyromonas gingivalis* (Crawford et al. 2000, Imamura et al. 2003). **W przypadku takiego scenariusza chroniczna paradontoza może być kolejnym przykładem przewlekłej choroby zapalnej indukowanej lub nasilanej przez wywołane proteolitycznie zaburzone usuwanie komórek umierających.**

Akumulujące w miejscach stanu zapalnego neutrofile narażone są nie tylko na czynniki egzogenne, ale również ekspozycje na endogenne czynniki, takie jak bodźce stresogenne powiązane z zapaleniem np. podwyższoną temperaturę ciała. W związku tym zadaliśmy sobie pytanie jaki będzie wpływ krótkiego szoku cieplnego, w zakresie temperatur i czasu trwania odpowiadający krótkotrwałym epizodom podwyższonej temperatury podczas infekcji, na neutrofile ludzkiej krwi obwodowej. W pracy opublikowanej w 2011 roku (Bzowska et al. 2011) pokazaliśmy, że krótki (90-cio minutowy) stres cieplny w zakresie temperatur od 39°C do 43°C nie jest letalny dla neutrofilii, a wręcz przeciwnie podobnie do czynników zapalnych opóźnia proces spontanicznej apoptozy tych komórek. Inaczej niż ma to miejsce w przypadku apoptotycznych PMN, komórki szokowane cieplnie zachowują asymetrię błony typową dla komórek żywych, w pełni funkcjonalnych. Nie stwierdziliśmy również zmiany ekspresji wybranych cząsteczek powierzchniowych związanych z rozpoznaniem umierających neutrofilii i klasyfikowanych jako sygnały „nie jedz mnie” – CD31 i CD47 - lub „zjedz mnie” - Aneksyna I i Aneksyna II. **Co ciekawe, mimo iż nie obserwowaliśmy typowych markerów apoptozy podwyższona temperatura wywoływała jednak natychmiastową modulację wzoru molekularnego na powierzchni szokowanych cieplnie neutrofilii, wyrażającą się w postaci znaczącego obniżenia ekspresji receptora FcγRIII (CD16).** CD16 obecna na powierzchni PMN może być, tak jak ma to miejsce w przypadku neutrofilii apoptotycznych, aktywnie złuszczana przez metaloproteinazy (Middelhoven et al. 2001), jednakże nie stwierdziliśmy zmian stężenia rozpuszczalnego CD16 w mediach z komórek inkubowanych w podwyższonej temperaturze. Wynik ten wskazuje, że redukcja ekspresji CD16 nie jest w tym przypadku związana z jej ścinaniem z powierzchni komórki, a raczej obniżonym wyprowadzaniem z wewnątrzkomórkowych zasobów tego receptora znajdujących się w ziarnach wydzielniczych. Nie byliśmy w stanie, tak jak miało to miejsce w oryginalnej obserwacji opisanej przez Dransfield et al. 1994, pokazać korelacji pomiędzy redukcją ekspresji CD16 na neutrofilach szokowanych cieplnie a ich apoptozą. Szok cieplny ewidentnie spowalniał spontaniczną apoptozę

PMN, jednocześnie wywołując spadek ekspresji CD16. Kiedy szok cieplny poprzedzony został preinkubacją PMN z inhibitorami białka HSP90 zaobserwowaliśmy ekspresję CD16 na poziomie osiągającym zaledwie 20% kontroli oraz całkowitą blokadę fragmentacji DNA w neutrofilach. Uzyskane przez nas wyniki wyraźnie sugerują hamowanie fazy efektorowej apoptozy w neutrofilach szokowanych cieplnie, co z kolei podnosi pytanie o dalsze losy tych komórek, a konkretnie ich potencjalne rozpoznanie przez makrofagi. Wykorzystując opracowaną wcześniej metodę badania fagocytozy neutrofilii w oparciu o pomiar aktywności elastazy w lizatach z makrofagów mogliśmy w sposób ilościowy, analizować pochtanianie tych komórek przez ludzkie makrofagi wyprowadzane z monocytów. Uzyskane wyniki pozwoliły nam skonkludować, że szok cieplny nie generuje sygnałów wystarczających do fagocytozy neutrofilii przez makrofagi. **Co zaskakujące, poddane działaniu czynnika stresogennego neutrofile nie są wprawdzie fagocytowane, ale wywołują w makrofagach efekt przeciwzapalny, hamując produkcję TNF stymulowaną ligandami receptorów TLR. Wynik ten jest zaskakujący z dwu powodów. Po pierwsze, przeciwzapalne rozpoznanie szokowanych cieplnie neutrofilii zachodzi bez ich usuwania na drodze fagocytozy, a po drugie, szokowane cieplnie neutrofile nie wykazują na swojej powierzchni ekspresji PtdSer, która zazwyczaj pociąga za sobą przeciwzapalne konsekwencje rozpoznania.** Obserwacje opisane przez nas są pod paroma względami unikatowe: inaczej niż ma to miejsce w przypadku komórek apoptotycznych, szokowane cieplnie neutrofile nie generują rozpuszczalnego CD16, ich program apoptotyczny ulega spowolnieniu, nie są pochtaniane przez makrofagi, modulacja ekspresji powierzchniowego CD16 koreluje ze zdolnością tych komórek do redukcji odpowiedzi prozapalnej makrofagów, a blokowanie tej zdolności za pomocą przeciwciał anti-CD16 wyraźnie sugeruje związek przyczynowy. Nadal nie jest jasne, jak makrofagi rozpoznają niższą ekspresję CD16 oraz w jaki sposób odczytywane jest to jako sygnał przeciwzapalny, zwłaszcza bez typowych symptomów apoptozy takich jak eksternalizacja PtdSer czy obniżona ekspresja sygnałów „nie jedz mnie” - CD31 i CD47. **Na podstawie uzyskanych wyników postulujemy jednak nową rolę regulacyjną, w której neutrofile poddane działaniu podwyższonej temperatury nie są usuwane przez rezydentne makrofagi, zachowują przynajmniej niektóre swoje funkcje życiowe i co najważniejsze, mogą zastępować komórki apoptotyczne w ich funkcji przeciwzapalnej.** Można sobie wyobrazić, że opisany przez nas mechanizm może w znacznym stopniu przyczyniać się do zachowania homeostazy podczas epizodów gorączki znanych pod ogólną nazwą gorączki przerywanej (ang. *intermittent fever*), kiedy podniesiona temperatura jest obserwowana tylko przez kilka godzin w ciągu dnia i pozostaje prawidłowa przez pozostały czas trwania infekcji. Proponowany scenariusz rzuca pewne światło na protekcyjną rolę gorączki, wskazując, że temperatura i czas trwania gorączki mogą być krytyczne dla homeostazy.

4.3.5 Komponenty kompleksów receptorowych tworzących się w błonie monocytów/makrofagów podczas rozpoznania wybranych wzorów molekularnych

Bzowska M, Nogiec A, Bania K, Zygmunt M, Zarębski M, Dobrucki J, Guzik K. Involvement of cell surface 90 kDa heat shock protein (HSP90) in pattern recognition by human monocyte-derived macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* **2017** Sep;102(3):763-774.

Powstawanie wieloskładnikowych kompleksów receptorów w obrębie tratwy lipidowej w błonie komórek fagocytujących opisano po raz pierwszy w przypadku odpowiedzi na prototypowy PAMP – LPS bakterii gram-ujemnych (Trantafilou et al. 2001). W monocytach po związaniu LPS do jego receptorów (CD14, TLR4/MD2), w powstających kompleksach obserwuje się również receptory chemokin CXCR4, integryny CD11b/CD18, receptory FcγR (CD16, CD32, CD64), CD36, CD81, GDF5 oraz białka szoku cieplnego HSP70 i HSP90 (Trantafilou et al. 2002, Pfeiffer et al. 2001, Trantafilou et al. 2004). Białko HSP90, najmniej spodziewany składnik tratwy receptorowej, należy do wysoce konserwatywnej grupy białek opiekuńczych (ang. *molecular chaperones*), które są konstytutywnie obecne we wszystkich przedziałach komórkowych, a ich główną funkcją jest ochrona natywnej konformacji innych białek przed nieprawidłowym fałdowaniem i nieodwracalną agregacją. U kręgowców wyróżnia się cztery izoformy białka HSP90: dwie cytoplazmatyczne - HSP90α i HSP90β, jedną mitochondrialną (Trap-1, ang. *TNF receptor-associated protein 1*) i jedną specyficzną dla siateczki śródplazmatycznej (Grp94, ang. *Glucose regulated protein 94*) (Chen et al. 2005). Wszystkie z tych izoform funkcjonują jako obligatoryjne dimery. W monomerze białka HSP90 wyróżnia się trzy domeny: domena N-końcowa wiążąca ATP, domena środkowa, która odpowiedzialna jest za interakcje z klientem oraz wpływa na hydrolizę ATP oraz domena C-końcowa będąca miejscem dimeryzacji. Aktywność ATPazowa HSP90 jest konieczna do sprawowania przez niego funkcji opiekuńczej *in vivo*, a zależne od ATP zmiany konformacyjne HSP90 indukują zmiany konformacyjne klientów, które z kolei sprzyjają wiązaniu ligandów lub białek partnerskich. Wyjątkową cechą HSP90 jest funkcja biologiczna jego klientów: jest to stosunkowo nieliczna (zidentyfikowano około 400) grupa białek zaangażowanych w transdukcję sygnału. Większość z nich to kinazy sygnałowe, poza tym czynniki transkrypcyjne i receptory jądrowe (Taipale et al. 2010). W celu wykonania swojej funkcji opiekuńczej HSP90, HSP70, czynniki wymiany nukleotydów i duża grupa białek pomocniczych zwanych kochaperonami tworzą dynamiczne struktury znane jako kompleksy superchaperonowe, przy czym skład tych kompleksów jest specyficzny dla rodzaju klienta, a aktywność HSP90 zależy bardziej od interakcji z kochaperonami niż od samej ilości tego białka w komórce (Röhl et al. 2013). Nietypowa kieszeń wiążąca ATP, zwana fałdą Bergerata, obecna w domenie N-końcowej jest unikatowa dla rodziny HSP90, co wyjaśnia niezwykłą specyficzność naturalnych inhibitorów HSP90: geldanamycy, radicicolu oraz ich pochodnych (Roe et al. 1999). Geldanamycyna jest

benzochinonowym antybiotykiem ansamycynowym wyizolowanym ze *Streptomyces hygroscopicus*, który wiąże się specyficznie do HSP90, a także do jego homologu Grp94. Radicicol jest makrocyklicznym przeciwrzybiczym antybiotykiem z *Monosporium bonorden*. Oba te związki, ich półsyntetyczne pochodne, a także w pełni syntetyczne analogi hamują aktywność ATPazową HSP90, powodując dysocjację kompleksu, uwolnienie i degradację klienta. Z uwagi na potencjalne zastosowanie w terapiach przeciwnowotworowych wiele z tych związków znajduje się w fazie badań klinicznych (Neckers et al. 2014). W ostatnich latach, coraz więcej badań zwraca uwagę na obecność białka HSP90 na powierzchni komórek, szczególnie komórek nowotworowych, gdzie przypisuje mu się rolę w regulowaniu migracji (Tsutsumi et al. 2007, Liu et al. 2011). Jak wspomniano wcześniej HSP90 zidentyfikowane zostało również jako składnik tratw receptorowych na powierzchni monocytów. O ile wiadomo, że wewnątrzkomórkowe HSP90 pełni istotną rolę w przekazie sygnału w komórce, o tyle funkcja tego białka na powierzchni komórek prawidłowych pozostaje niewyjaśniona. Uzyskane przeze mnie finansowanie (NCN N N303 808640 „Udział HSP90 w rozpoznaniu wzoru molekularnego przez receptory TLR - mechanizm i konsekwencje dla układu odpornościowego” 2011 – 2014 oraz KNOW 35+ „Mechanizm działania powierzchniowego HSP90 w rozpoznawaniu wzorów molekularnych przez makrofagi”) pozwoliło mi na podjęcie szczegółowych badań monocytów i makrofagów ludzkich pod kątem ewentualnej obecności powierzchniowego HSP90 w tych komórkach oraz funkcji tego białka w rozpoznaniu wzorów molekularnych. Efektem tych badań jest praca Bzowska et al. 2017, w której po raz pierwszy w sposób kompleksowy i systematyczny, przy pomocy specyficznych przeciwciał i cytometrii przepływowej wykazano obecność obu izoform białka HSP90 (HSP90 α i HSP90 β), jak również ekspozycję jego N-końcowej domeny o aktywności ATPazowej na powierzchni spoczynkowych ludzkich monocytów oraz wyprowadzanych z nich makrofagów. Na podstawie uzyskanych przeze mnie wyników stwierdziłam również, że ekspozycja epitopów HSP90 obecnego w błonie monocytów i makrofagów wydaje się być nieco odmienna. O ile oba typy komórek wiążą przeciwciało - klon AC88, tylko monocyty wykazują sygnał pozytywny dla klonu 2D12. Jednocześnie, nie stwierdziliśmy powierzchniowej ekspresji HSP90 w innym typie komórek fagocytujących – neutrofilach ludzkich (Skrzeczyńska-Moncznik et al. 2015), co wspiera pogląd, że mechanizmy rozpoznania wzoru molekularnego przez jednojądrzaste i wielojądrzaste fagocyty są różne. W toku dalszych analiz, powierzchniowa ekspresja HSP90 na makrofagach została potwierdzona immunofluorescencyjnie metodą mikroskopii konfokalnej, a następnie dodatkowo zweryfikowana poprzez inne podejście metodyczne, w którym wykorzystaliśmy jeden ze specyficznych inhibitorów HSP90 – geldanamycynę - z dołączoną na długim hydrofobowym odstępniku biotyną (GeB) lub izotiocyjanianem fluoresceiny (GeFITC). Analizy konfokalne żywych, spoczynkowych makrofagów inkubowanych z GeFITC lub GeB i następnie znakowanymi

fluorescencyjnie przeciwciałami skierowanymi przeciwko biotynie udowodniły, że **N-końcowa ATPazowa domena HSP90 jest dostępna z przestrzeni pozakomórkowej nie tylko dla specyficznych przeciwciał anti-HSP90, ale również dla inhibitora. Analizy obrazów 3D tak znakowanych komórek potwierdziły powierzchniową lokalizację HSP90.** W następnym cyklu eksperymentów, wykorzystując mikroskopię konfokalną udowodniliśmy, że zmodyfikowana geldanamycyna – GeB - nie penetruje błony żywej komórki i wiąże się wyłącznie do powierzchniowej puli HSP90, co stało się dla nas cennym narzędziem w dalszych badaniach. Po dłuższej inkubacji inhibitor nadal nie wnikał do cytoplazmy, natomiast białko HSP90 z inhibitorem ulegało recyrkulacji z powierzchni komórki i akumuloowało w endosomach na granicy okołojądrowej cytoplazmy.

Równolegle podjęliśmy badania funkcjonalne, w których zaobserwowaliśmy, że zahamowanie aktywności ATPazowej HSP90 przy pomocy inhibitorów wnikaających do komórki (geldanamycyna, radicicol, 17-DMAG) zarówno w monocytach jak i wyprowadzanych z nich makrofagach prowadzi do dramatycznego obniżenia produkcji TNF w odpowiedzi na różnorodne wzory molekularne (ligandy receptorów TLR czy zabite ciepłnie bakterie). Wynik ten nie był zaskakujący i pozostawał spójny z dobrze znaną rolą HSP90 jako głównego białka opiekuńczego maszynarii sygnałowej w komórce oraz opisywanym wcześniej potencjałem przeciwzapalnym inhibitorów HSP90 (Shimp et al. 2012, Chatterjee et al. 2007). Jednakże, nasze kolejne wyniki uzyskane przy zastosowaniu modyfikowanej, nie wnikającej do wnętrza komórki geldanamycyny biotynylowanej rzuciły wyzwanie pogładowi, że cytoplazmatyczne HSP90 jest kluczowym czynnikiem w indukowanej PAMP produkcji TNF. **Otóż okazało się, że blokowanie wyłącznie powierzchniowej puli HSP90 przy pomocy GeB obniża produkcję TNF niemal tak skutecznie jak inhibitory penetrujące błonę komórki.** Co interesujące, analiza sekretomu makrofagów, stymulowanych LPS wskazuje, że skutki inhibicji powierzchniowej puli HSP90 są cytokinowo selektywne. Sekrecja dwu kluczowych cytokin prozapalnych - TNF i IL-6 - była znacznie bardziej hamowana, niż produkcja pozostałych badanych białek. Jeszcze bardziej zróżnicowany wpływ biotynylowanej geldanamycyny zaobserwowano w przypadku stymulowanej LPS produkcji chemokin. Stwierdziliśmy dramatyczne obniżenie sekrecji MCP-1, IP-10 i MIG, podczas gdy uwalnianie RANTES i IL-8 pozostało nie zmienione. Pokazaliśmy również, że zmodyfikowana odpowiedź makrofagów traktowanych inhibitorami HSP90 nie może być przypisana ani zredukowanej żywotności, ani zmienionej ekspresji receptorów TLR, ani ich koreceptorów. Uzyskane dane do pewnego stopnia przypominają wyniki demonstrujące, że obecny na powierzchni monocytów HSP90 zaangażowany jest w aktywację komórki adhezyną z *Neisseria meningitidis* i następującą po niej produkcję cytokin (Cecchini et al. 2011). W pracy Sidera et al. 2008 pokazano interakcję błonowego HSP90 z zewnątrzkomórkową domeną receptora HER2, a oddziaływanie to było konieczne do aktywacji HER2 i następującemu po

niej sygnałowaniu, prowadzącemu do rearażacji aktywności i ruchu komórki. Opisana przez nas regulacja produkcji cytokin przez GeB analizowana była zarówno w odpowiedzi na pojedyncze dobrze zdefiniowane ligandy receptorów TLR, jak również antygeny cząsteczkowe, takie jak zabite ciepłnie bakterie. Powstało zatem przypuszczenie, że skoro inhibicja powierzchniowego HSP90 modyfikuje rozpoznanie wzoru molekularnego mierzone produkcją cytokin, będzie prawdopodobnie wpływać na proces fagocytozy. **Ku naszemu zaskoczeniu okazało się jednak, że powierzchniowe funkcjonalne białko HSP90 nie jest konieczne do skutecznej fagocytozy ani bakterii, ani apoptotycznych neutrofilii.** W tym przypadku ani geldanamycyna, ani jej syntetyczna pochodna 17-DMAG, ani nie wnikażąca do wnętrza komórki geldanamycyna biotynylowana nie zmieniały aktywności fagocytarnej makrofagów. Wyraźne obniżenie zdolności fagocytarnej obserwowane było wyłącznie w komórkach traktowanych radicolem, co z uwagi na specyficzność tego inhibitora, prawdopodobnie wynika z inhibicji kinazy c-Src, w sposób niezależny od HSP90 (Pillay et al. 1996). **Uzyskane wyniki wskazują, że opiekuńcza funkcja powierzchniowego HSP90 w ludzkich monocytach i makrofagach jest niezbędna podczas rozpoznania różnorodnych wzorów molekularnych, kiedy przekaz sygnału z wielu heterologicznych receptorów musi, w celu wygenerowania prawidłowej odpowiedzi, zostać skoordynowany w czasie i przestrzeni.**

4.3.6 Najważniejsze wnioski płynące z prac, stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego:

- Rozpoznanie wzorów molekularnych związanych z komórkami apoptotycznymi przez monocytę krwi obwodowej człowieka stymulowane czynnikami pochodzenia baterijnego (PAMP) podwyższa produkcję cytokiny przeciwzapalnej IL-10, przy nieznacznym wpływie na produkcję cytokin prozapalnych TNF i IL-1 β . Wynik ten wskazuje na potencjalną różnicę w mechanizmach regulacji procesu zapalnego w tkankach (makrofagi i zwiększona produkcja TGF β) i w krążeniu (monocyty i zwiększona produkcja IL-10) po fagocytozie komórek apoptotycznych.
- Klasyczny czynnik ryzyka miażdżycy - utlenione lipoproteiny o niskiej gęstości (oxLDL) modulują rozpoznanie PAMP przez monocytę krwi obwodowej człowieka. Obecność oxLDL wyraźnie hamuje uwalnianie cytokiny przeciwzapalnej - IL-10 przez monocytę stymulowaną ligandami TLR2 i TLR4, pozostając bez wpływu na sekrecję TNF. W efekcie potencjał monocytów do odpowiedzi przeciwzapalnej ulega obniżeniu, co z kolei może sprzyjać rozwojowi chronicznego zapalenia w przebiegu miażdżycy. Zaburzone rozpoznanie PAMP przez monocytę w obecności oxLDL może być zaproponowane jako nowy, ogólny patomechanizm miażdżycy nasilanej patogenami. Zaburzony balans pomiędzy pro- i przeciwzapalnymi cytokinami produkowanymi przez monocytę w obecności oxLDL

szczególnie widoczny jest podczas odpowiedzi na LPS z *Porphyromonas gingivalis*. Badania mechanizmu tego zjawiska ujawniły, że warunkiem optymalnej produkcji IL-10 przez monocyty w odpowiedzi na LPS z *Porphyromonas gingivalis* jest interakcja TLR2 z receptorami witronektyny oraz integryną CD11b w tratwie receptorowej. Receptor witronektyny wydaje się być głównym celem hamującego działania utlenionych fosfolipidów na produkcję IL-10.

- Proteolityczne mikrośrodowisko w miejscu infekcji zmienia wzór molekularny na powierzchni neutrofilii modulując ich rozpoznanie przez makrofagi wyprowadzane z monocytów. Enzym gospodarza - katepsyna G - niemal całkowicie hamuje pochłanianie apoptotycznych neutrofilii, natomiast enzymy proteolityczne produkowane przez bakterie *Porphyromonas gingivalis* - gingipainy R - nasilają fagocytozę apoptotycznych oraz indukują fagocytozę żywych, w pełni funkcjonalnych PMN przez makrofagi. W obu przypadkach wpływ enzymów proteolitycznych na pochłanianie PMN nie jest związany z modyfikacją na ich powierzchni kluczowego sygnału „zjedz mnie” – fosfatydyloseryny. Uzyskane wyniki wskazują na białkowy charakter modyfikowanego ligandu/ów, a co za tym idzie sugerują, że pochłanianie apoptotycznych komórek przez makrofagi zależne od rozpoznania fosfatydyloseryny nie jest jedynym mechanizmem usuwania umierających PMN. W kontekście paradontozy opisane zjawiska mogą z jednej strony prowadzić do obniżania liczby funkcjonalnych neutrofilii i sprzyjać kolonizacji tkanek przez bakterie, a z drugiej, kiedy w środowisku pojawią się enzymy proteolityczne gospodarza może dojść do nieefektywnego pochłaniania komórek apoptotycznych i ich wtórnej nekrozy, a w konsekwencji powstania przewlekłego stanu zapalnego, który jest cechą charakterystyczną klinicznego obrazu paradontozy.
- Czynniki stresogenne związane z zapaleniem takie jak podwyższona temperatura zmieniają wzór molekularny na powierzchni neutrofilii modulując ich rozpoznanie przez makrofagi wyprowadzane z monocytów. Krótkotrwały (90-cio minutowy) szok cieplny w zakresie temperatur 39°C - 43°C hamuje charakterystyczną dla apoptozy fragmentację DNA w neutrofilach, jednocześnie powodując znaczącą redukcję ekspresji receptora FcγRIII (CD16), bez współwystępowania typowych cech apoptozy. Neutrofile szokowane cieplnie nabierają potencjału przeciwzapalnego - nie są wprawdzie fagocytowane przez makrofagi, ale ich rozpoznanie wywołuje efekt przeciwzapalny, hamując produkcję TNF stymulowaną ligandami receptorów TLR. Niezapalne rozpoznanie pozostaje w ścisłym powiązaniu ze zredukowaną ekspresją CD16. Uważamy, że opisane przez nas zjawisko może stanowić nowy, systemowy aspekt podniesionej temperatury ciała, który polega na natychmiastowej modyfikacji wzoru molekularnego niesionego przez neutrofile. Efekt ten wyprzedza śmierć

komórki i może w początkowej fazie zapalenia dostarczać sygnałów przeciwzapalnych, zanim swoją rolę wobec makrofagów spełnią komórki apoptotyczne.

- Białko szoku cieplnego - HSP90 jest obecne na powierzchni ludzkich monocytów oraz wyprowadzanych z nich makrofagów. Powierzchniowe HSP90 ekspozuje do przestrzeni pozakomórkowej N-końcową domenę o aktywności ATPazowej, która rozpoznawana jest przez specyficzne przeciwciała oraz zdolna do wiązania specyficznego inhibitora – geldanamycyny. Selektywna inhibicja powierzchniowego HSP90 hamuje produkcję cytokin prozapalnych przez monocyty i makrofagi w odpowiedzi na wzory PAMP, jednocześnie nie wpływając na aktywność fagocytarną tych komórek. Uzyskane wyniki wskazują na opiekuńczą funkcję powierzchniowego HSP90 wobec kompleksów sygnałowych powstających podczas rozpoznania różnorodnych wzorów molekularnych przez ludzkie monocyty i makrofagi. W świetle tego faktu powierzchniowe HSP90 może stanowić nowy cel w leczeniu chorób zapalnych związanych z rozpoznaniem wzorów.

5 Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

W niniejszej części omówiłam wybrane aspekty moich prac badawczych, których wyniki nie zostały włączone do rozprawy habilitacyjnej. Dla celów niniejszego autoreferatu publikacje te podzieliłam na kilka obszarów tematycznych. Wszystkie opisane badania prowadzone były po uzyskaniu doktoratu, a cytowane publikacje powstały po jego obronie.

5.1 Wybrane parametry układu immunologicznego u pacjentów z atopowym zapaleniem skóry.

Atopowe zapalenie skóry – AZS - jest przewlekłą i nawrotową dermatozą zapalną. Typowym objawem jest nasilony świąd skóry oraz pojawianie się zapalnego procesu atopowego w innych narządach takich jak układ oddechowy czy przewód pokarmowy. Patogeneza AZS nie jest w pełni wyjaśniona, a składają się na nią zarówno czynniki genetyczne, dysfunkcje wrodzonej oraz nabytej odpowiedzi immunologicznej oraz rozmaite czynniki środowiskowe. W latach 1995 – 2005 w ramach współpracy z Katedrą i Kliniką Chorób Wewnętrznych i Medycyny Wsi, Collegium Medicum, Uniwersytetu Jagiellońskiego prowadziliśmy badania mające na celu analizę wybranych parametrów odporności komórkowej i humoralnej u pacjentów z AZS. W badaniach tych byłam odpowiedzialna za koordynację i/lub wykonanie analiz fenotypu i proliferacji limfocytów oraz uwalniania reaktywnych form tlenu przez neutrofile krwi obwodowej. W badanej grupie pacjentów określone były ponadto poziomy immunoglobulin oraz wykonywana była ilościowa ocena *S. aureus* na skórze, w przedsionku nosa i gardle. Prowadzone badania zaowocowały trzema publikacjami doświadczalnymi z moim współautorstwem: **Adamek-Guzik et al. 2001**, **Guzik et al. 2002**, **Guzik et al. 2005**. W porównaniu do grupy kontrolnej, zaobserwowaliśmy znacząco podniesione poziomy

immunoglobulin klasy IgE w surowicy pacjentów z AZS, które dodatkowo wykazywały silną korelację z nasileniem choroby i obniżały się wraz z poprawą stanu klinicznego. Atopowe zapalenie skóry było również związane ze wzrostem odsetka limfocytów CD4+ i jednoczesnym zmniejszeniem odsetka limfocytów CD8+, a stosunek CD4 do CD8 wyraźnie malał podczas stosowanego leczenia. U pacjentów z AZS w trakcie zaostrzenia objawów zaobserwowano wyraźnie niższą proliferację limfocytów krwi obwodowej w odpowiedzi na mitogeny, która po pierwszych 4 tygodniach leczenia osiągnęła poziomy obserwowane u zdrowych dawców. Podczas zaostrzenia stwierdzono obecność *S. aureus* na skórze wszystkich pacjentów z AZS, a wskaźnik nasilenia choroby (SCORAD) korelował z gęstością bakterii. Leczenie doustnymi lekami przeciwhistaminowymi i miejscowo steroidami spowodowało znaczne złagodzenie objawów, które korelowały z eliminacją *S. aureus* ze skóry u 70% pacjentów. U pozostałych 30% pacjentów, u których kolonizacja skóry przez *S. aureus* utrzymywała się pomimo leczenia stwierdzono wyższy poziom IgE oraz obniżoną zdolność do proliferacji limfocytów w odpowiedzi zarówno na enterotoksynę B gronkowca, fitohemaglutyninę jak i anty-CD3. **Podsumowując, możemy stwierdzić, że doustne leki przeciwhistaminowe w połączeniu z miejscowym stosowaniem steroidów prowadzą do kilku istotnych zmian parametrów immunologicznych takich jak poziom IgE, stosunek CD4: CD8 i wskaźniki proliferacji, jednak żaden z badanych przez nas parametrów immunologicznych nie okazał się w sposób istotny statystycznie skorelowany ze stanem klinicznym.**

Wybrane publikacje związane z tym zagadnieniem:

1. Adamek-Guzik, T., Guzik T.J., **Bzowska, M.**, Czerniawska-Mysik, G., Szmyd, D., Międzobrodzki, J. and Pryjma, J. Selected parameters of the cellular and humoral immunity in atopic dermatitis. Relationship to the severity of the disease. *Przegląd Lekarski*, **2001**, 58:1029-1033.
MNiSW₂₀₁₇ = 10, praca cytowana 2 razy
2. Guzik TJ, Adamek-Guzik T, **Bzowska M**, Międzobrodzki J, Czerniawska-Mysik G, Pryjma J. [Influence of treating atopic dermatitis with oral antihistamine and topical steroids on selected parameters of cell and humoral immunity]. *Folia Medica Cracoviensis*, **2002**; 43(1-2):79-93. Polish.
MNiSW₂₀₁₇ = 10, praca cytowana 2 razy
3. Guzik TJ, **Bzowska M**, Kasprowicz A, Czerniawska-Mysik G, Wojcik K, Szmyd D, Adamek-Guzik T, Pryjma J. Persistent skin colonization with *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis: relationship to clinical and immunological parameters. *Clin Exp Allergy*, **2005**, 35:448-55.
IF₂₀₀₅=3.553, MNiSW₂₀₁₇ = 40, praca cytowana 82 razy

5.2 Subpopulacje monocytów w homeostazie i stanach chorobowych

Jak wspomniano wcześniej moje zainteresowania badawcze koncentrują się wokół profesjonalnych fagocytów, a w pracy badawczej wykorzystuję przede wszystkim komórki pierwotne izolowane z ludzkiej krwi obwodowej. Niemal od początku mojej pracy zawodowej dysponowaliśmy unikatową w skali kraju metodą izolacji monocytów krwi obwodowej poprzez wirowanie z jednoczesnym przeciwwądownym wypłukiwaniem (elutracja). Metoda ta daje możliwość uzyskania

frakcji czystych nieadherentnych monocytów bez ingerencji w funkcje receptorów powierzchniowych na tych komórkach, tak jak ma to miejsce w przypadku technik opartych o sortowanie fluorescencyjne czy magnetyczne. Posiadany przez nas warsztat oraz współpraca z ośrodkami naukowymi w Niemczech (Research Center Borstel oraz Ruhr University) pozwolił na aktywne włączenie się w nurt badań dotyczących heterogenności monocytów krwi obwodowej człowieka. W pracy **Grage-Griebenow et al. 2000** pokazaliśmy, że subpopulacje monocytów definiowane na podstawie ekspresji receptorów dla fragmentu Fc immunoglobulin IgG – FcγRI (CD64) i FcγRIII (CD16) różnią się między sobą zdolnością do fagocytozy opsonizowanych bakterii (*S. aureus*, *E. coli*) oraz produkcji reaktywnych form tlenu. Innym podejściem do analiz heterogenności monocytów jest identyfikacja ich subpopulacji w oparciu o ekspresję receptora dla LPS (CD14) oraz wspomnianego już FcγRIII (CD16) (Passlick et al. 1989). U człowieka większość czyli około 90% krążących monocytów wykazuje wysoką ekspresją receptora CD14 i brak ekspresji CD16. Ta populacja komórek opisywana jako CD14^{high}CD16⁻ uznawana jest za „monocyty klasyczne”. Pozostałe 10% komórek wykazujących ekspresję CD16 oraz relatywnie niską ekspresję CD14, klasyfikowane jako CD14^{dim}CD16⁺ nazywane jest „monocytami nie klasycznymi”. W pracy **Skrzeżyńską-Moncznik et al. 2008** zwróciliśmy uwagę na jeszcze jedną, pośrednią subpopulację monocytów wykazujących ekspresję CD16 przy jednoczesnej wysokiej ekspresji CD14 - CD14^{high}CD16⁺. Subpopulacja ta we wcześniejszych publikowanych analizach była pomijana, głównie z powodu niewielkiego jej odsetka w krwi zdrowych dawców, jak również trudności w jej jednoznacznym wyodrębnieniu. Najważniejszym naszym osiągnięciem badawczym było pokazanie, że monocyty CD14^{high}CD16⁺ w porównaniu do monocytów klasycznych CD14^{high}CD16⁻ oraz komórek CD14^{dim}CD16⁺ wykazują znacznie wyższy potencjał do produkcji cytokiny przeciwzapalnej - IL-10. Aktualne dane kliniczne wskazują, że populacja ta wykazuje pewne cechy unikatowe, a jej odsetek zmienia się w wielu stanach patologicznych. W związku z naszym zainteresowaniem heterogennością monocytów krążących oraz udziałem tych komórek w patomechanizmie miażdżycy, we współpracy z prof. dr hab. Tomaszem Guzikiem (Katedra Chorób Wewnętrznych i Medycyny Wsi, Collegium Medicum UJ) podjęliśmy badania, w których na dobrze scharakteryzowanym materiale klinicznym poszukiwaliśmy korelacji pomiędzy czynnikami ryzyka miażdżycy a subpopulacjami monocytów obecnymi w krwi obwodowej pacjentów. Z uwagi na silne przeciwzapalne działanie IL-10, monocyty CD14^{high}CD16⁺ jako główny producent tej cytokiny mogłyby wykazywać przeciwmiażdżycowy charakter. Stwierdzono jednak, że odsetek tej właśnie subpopulacji jest podwyższony w grupie pacjentów z czynnikami ryzyka miażdżycy w porównaniu do osób zdrowych, przy czym najsilniejszą korelację zaobserwowano dla pacjentów z nadciśnieniem, szczególnie w tej grupie, gdzie nadciśnienie było źle kontrolowane. Dodatkowo, u pacjentów z czynnikami ryzyka miażdżycy nie zaobserwowano korelacji pomiędzy

produkcją IL-10 a odsetkiem subpopulacji CD14^{high}CD16⁺, natomiast większy udział tej populacji korelował z produkcją TNF. Wydaje się więc, że monocyty o fenotypie CD14^{high}CD16⁺ u pacjentów z czynnikami ryzyka miażdżycy są funkcjonalnie odmienne od komórek obecnych w krwi zdrowych dawców. Uzyskane wyniki zaprezentowane zostały w postaci pięciu doniesień zjazdowych, z czego cztery na konferencjach międzynarodowych, a streszczenia trzech z nich zostały opublikowane w renomowanych czasopismach: *Circulation* oraz *Atherosclerosis supplement*. **Podsumowując tę część badań, możemy stwierdzić, że u zdrowych osób subpopulacja monocytów CD14^{high}CD16⁺ jest głównym producentem IL-10. Odsetek tych komórek wzrasta w krwi obwodowej pacjentów z czynnikami ryzyka miażdżycy, szczególnie u osób ze źle kontrolowanym nadciśnieniem, aczkolwiek funkcjonalnie subpopulacja ta wydaje się być zmieniona w porównaniu do monocytów obecnych w krwi osób zdrowych.**

Wybrane publikacje związane z tym zagadnieniem:

1. Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M, **Bzowska M**, Skrzeczyńska J, Pryjma J. Human MO subsets as defined by expression of CD64 and CD16 differ in phagocytic activity and generation of oxygen intermediates. *Immunobiology* **2000** 202:42.
IF₂₀₀₀ = 2.416, MNiSW₂₀₁₇ = 30, praca cytowana 50 razy
2. Skrzeczyńska-Moncznik J, **Bzowska M**, Loseke S, Grage-Griebenow E, Zembala M, Pryjma J. Peripheral blood CD14^{high}CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. *Scandinavian Journal of Immunology* **2008** 67:152-159.
IF₂₀₀₈ = 2.186, MNiSW₂₀₁₇ = 20, praca cytowana 163 razy
3. Guzik TJ, **Bzowska M**, Czesnikiewicz-Guzik M, Jasiewicz-Honkisz B, Adamek-Guzik T, Korbut R, Pryjma J. Hypertension is associated with phenotypic changes of peripheral blood monocytes. *Circulation* **2007** Oct;116(16):123. Streszczenie.
4. Guzik T, **Bzowska M**, Jasiewicz-Honkisz B, Czesnikiewicz-Guzik M, Korbut R, Pryjma J. Risk factors for atherosclerosis are associated with phenotypic changes of peripheral blood monocytes. *Atherosclerosis supplements* **2009** Jun; 10 (2). Streszczenie.
5. Czesnikiewicz-Guzik M, **Bzowska M**, Jasiewicz-Honkisz B, Korbut R, Naruszewicz M, Pryjma J, Guzik TJ. Peripheral Blood Monocytes Are Activated in Patients With Well Controlled Hypertension: Implications for the Understanding of the Residual Cardiovascular Risk. *Circulation* **2009** Nov; 120 (18): S1088. Streszczenie.

5.3 Immunoregulacyjna rola stresu i śmierci komórki

Obszarem badawczym, którym zainteresowanie wynika ze ścisłej współpracy z dr Krzysztofem Guzikiem z Zakładu Immunologii WBBiB UJ jest immunoregulacyjna rola stresu i śmierci komórki. Te zainteresowania badawcze realizowaliśmy okresowo również we współpracy z prof. dr hab. Janem Potempą z Zakładu Mikrobiologii WBBiB UJ. W 1996 roku w pracy Baran et al. pokazano, że fagocytoza bakterii przez monocyty krwi obwodowej prowadzi, w relatywnie krótkim czasie, do ich śmierci na drodze apoptozy. Zainteresowanie wpływem stresu komórkowego na biologię fagocytów sprowokowało nas do zadania pytania w jaki sposób reagować będą na fagocytozę bakterii

monocyty poddane wcześniej szokowi cieplnemu. W pracy **Guzik et al. 1999** pokazaliśmy, że godzinna ekspozycja monocytów na temperaturę 41,5°C nie ma wpływu na aktywność fagocytarną tych komórek i podobnie do komórek kontrolnych w szokowanych cieplnie monocytach fagocytoza *Staphylococcus aureus* indukuje śmierć apoptotyczną. Jednocześnie okazało się, że monocyty po upływie 18 do 24 godzin od szoku cieplnego stają się odporne na apoptozę wywoływaną przez fagocytozę *S. aureus*, a obserwowany efekt cytoochronny związany jest indukcją ekspresji jednego z białek szoku cieplnego - HSP72. W toku dalszych prac kierowanych przez dr Krzysztofa Guzika i dotyczących interakcji bakterii *S. aureus* z profesjonalnymi fagocytami, zaobserwowano, że bakterie *S. aureus* są w stanie przeżyć pochłanianie przez wyprowadzane z monocytów makrofagi, a wewnętrzne środowisko tych komórek w rzeczywistości stanowi schronienie dla gronkowców, co sprzyja ich przetrwaniu i rozprzestrzenianiu (Kubica et al. 2008). W publikacji **Koziel et al. 2009**, w której jestem współautorem pokazano ponadto, że makrofagi zakażone *S. aureus* są bardziej odporne na śmierć komórki indukowaną staurosporyną. Analiza transkryptomu tych komórek ujawniła znaczny wzrost ekspresji genów przeciwapoptotycznych: Bcl-2 i Mcl-1, co sugeruje, że *S. aureus* indukuje efekty cytoochronne w ludzkich makrofagach.

Jednym z intensywnie badanych w Zakładzie Mikrobiologii WBBiB UJ czynników produkowanych przez *S. aureus* była proteinaza cysteinowa Stafopaina B (SspB). O ile znaczenie tej proteiny dla patogenności bakterii było dobrze udokumentowane, o tyle jej udział w regulacji śmierci komórek fagocytujących pozostawał niejasny. W 2009 roku opublikowaliśmy dwie prace z moim współautorstwem (**Smagur et al.**), w których analizowaliśmy wpływ SspB na neutrofile i monocyty ludzkiej krwi obwodowej. Pokazaliśmy, że **SspB indukuje w neutrofilach oraz monocytach znaczący spadek ekspresji integryny CD11b oraz śmierć komórkową charakteryzującą się ekspozycją fosfatydyloseryny (PtdSer), ekspresją aneksyny I oraz przepuszczalnością błony komórkowej dla jodku propidyny**, wykazując w ten sposób cechy charakterystyczne zarówno dla apoptozy jak i nekrozy. Na śmierć komórki indukowaną przez SspB nie miały wpływu ligandy integryny CD11b, takie jak ICAM-1, natomiast była ona całkowicie hamowana przez immunoglobuliny IgG, a konkretniej ich fragmenty Fc, sugerując udział lateralnych interakcji receptora FcγRIII (CD16) i integryny CD11b w tym procesie. **Ekspozycja neutrofilii i monocytów na stafopainę B w znaczący sposób upośledza ich funkcje antybakteryjne tzn. hamuje fagocytozę *S. aureus*, obniża aktywność chemotaktyczną fagocytów i indukuje ich intensywne usuwanie przez ludzkie makrofagi. Za intensywną fagocytozę tych komórek przez makrofagi odpowiedzialna jest zarówno proteolityczna degradacja sygnałów odpychania - SspB ścina z powierzchni neutrofilii jeden z głównych sygnałów "nie jedz mnie" CD31 - jak i indukcja sygnałów o charakterze "zjedz mnie" na powierzchni neutrofilii.** Podsumowując sugerujemy, że stafopaina B, szczególnie w

obecności białka A gronkowca, może sprzyjać wyczerpaniu puli funkcjonalnych neutrofilów w miejscu zakażenia, ułatwiając w ten sposób kolonizację i rozprzestrzenianie się gronkowców.

Jak wspomniano wcześniej neutrofile to leukocyty, których czas życia jest ściśle kontrolowany, a usuwanie martwych, uszkodzonych komórek przez makrofagi stanowi istotny sygnał immunoregulacyjny. Proces ten jest szczególnie istotny w miejscach gdzie dochodzi do akumulacji dużych ilości PMN, tak jak ma to miejsce na przykład w płucach palaczy. W pracy **Guzik et al. 2011** analizowaliśmy jaki wpływ na ludzkie neutrofile mają czynniki obecne w dymie papierosowym. Okazało się, że **ekspozycja neutrofilów na ekstrakt dymu papierosowego CSE (ang. cigarette smoke extract) prowadzi do nietypowej śmierci PMN łączącej w sobie cechy apoptozy, autofagii i martwicy.** Zaobserwowano także gromadzenie substancji smołopodobnych w autofagosomach powstających w tych komórkach. Co ciekawe, **jeszcze przed pojawieniem się cech śmierci komórki, neutrofile traktowane CSE są skutecznie rozpoznawane i fagocytowane przez makrofagi bez indukcji odpowiedzi zapalnej.** Badania z użyciem specyficznych przeciwciał blokujących receptory na powierzchni makrofagów takie jak LOX1, SRA, MARCO i CD36 lub kompetycyjnych ligandów (oxLDL) wykazały, że struktury podobne do utlenionych lipidów obecne na powierzchni neutrofilów są głównymi sygnałami prowadzącymi do pochłaniania neutrofilów traktowanych CSE. Niezależnie od niezapalnej fagocytozy, zaobserwowaliśmy degranulację drugorzędowych ziarnistości przez neutrofile po ekspozycji na CSE, co w naszej opinii może sprzyjać degradacji tkanek i procesom zapalnym w płucach. Upośledzona zdolność do fagocytozy *S. aureus* przez neutrofile ekspozowane na CSE może z kolei przyczyniać się do utrzymywania się bakterii i sprzyjać dalszemu rekrutowaniu PMN do płuc palaczy. **Opisane przez nas mechanizmy tłumaczą obserwowane u palaczy: zwiększoną podatność na rozkładowe choroby płuc i infekcje bakteryjne oraz brak gromadzenia się apoptotycznych neutrofilów w płucach.**

Jednym z leków używanych u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym jest analog sfingozyny FTY720 znany także jako fingolimod lub Gilenya (Novartis). Postulowany mechanizm działania immunosupresyjnego tej substancji to indukcja apoptozy limfocytów. W związku z istotną rolą immunoregulacyjną śmierci i następowego usuwania umierających neutrofilów, wiedza na temat wpływu FTY720 na PMN mogłaby mieć duże znaczenie zarówno w kontekście potencjalnych skutków ubocznych jak i ewentualnych zastosowań terapeutycznych. **W pracy Skrzeczynska Moncznik et al. 2015 pokazaliśmy, że FTY720 indukuje w ludzkich neutrofilach śmierć komórkową o atypowych cechach.** Zaobserwowaliśmy pęcznienie i wakuolizację komórek, zmienioną morfologię jądra i atypowe barwienie chromatyny oraz szybką translokację białka szoku cieplnego - HSP27 na powierzchnię komórki i fosforylację białka MLKL. Fingolimod indukuje również typowe cechy apoptozy, w tym szybką eksternalizację PtdSer i aktywację kaspazy-8. Eksternalizacja

fosfatydyloseryny i HSP27 jest częściowo hamowana przez inhibitory kaspazy-8, kinazy RIP1 i RIP3, HSP90 oraz oksydazy NADPH, co sugeruje, że fingolimod działa w neutrofilach poprzez mechanizm obejmujący nekrosomalny kompleks sygnałowy oraz systemy stresu oksydacyjnego.

Wybrane publikacje związane z tym zagadnieniem:

1. Guzik K, **Bzowska M**, Dobrucki J, Pryjma J. Heat-shocked monocytes are resistant to *Staphylococcus aureus*-induced apoptotic DNA fragmentation due to expression of HSP-72. *Infection and Immunity* **1999** 67 : 4216-4222.
IF₁₉₉₉ = 4.184, MNiSW₂₀₁₇ = 40, praca cytowana 36 razy
2. Koziel J, Maciag-Gudowska A, Mikolajczyk T, **Bzowska M**, Sturdevant DE, Whitney AR, Shaw LN, DeLeo FR, Potempa J. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by macrophages exerts cytoprotective effects manifested by the upregulation of antiapoptotic factors. *PLoS One* **2009** 4(4):e5210.
IF₂₀₀₉ = 4.351, MNiSW₂₀₁₇ = 40, praca cytowana 82 razy
3. Smagur J, Guzik K, Magiera L, **Bzowska M**, Gruca M, Thøgersen IB, Enghild JJ, Potempa J. A new pathway of staphylococcal pathogenesis: apoptosis-like death induced by Staphopain B in human neutrophils and monocytes. *Journal of Innate Immunity* **2009** Jan;1(2):98-108.
MNiSW₂₀₁₇ = 35, praca cytowana 34 razy
4. Smagur J, Guzik K, **Bzowska M**, Kuzak M, Zarebski M, Kantyka T, Walski M, Gajkowska B, Potempa J. Staphylococcal cysteine protease staphopain B (SspB) induces rapid engulfment of human neutrophils and monocytes by macrophages. *Biological Chemistry* **2009** Apr;390(4):361-71.
IF₂₀₀₉ = 2.732, MNiSW₂₀₁₇ = 25, praca cytowana 29 razy
5. Guzik K, Skret J, Smagur J, **Bzowska M**, Gajkowska B, Scott DA, Potempa JS. Cigarette smoke-exposed neutrophils die unconventionally but are rapidly phagocytosed by macrophages. *Cell Death and Disease* **2011** 2:e131
IF₂₀₁₁ = 5.333, MNiSW₂₀₁₇ = 35, praca cytowana 23 razy
6. Skrzeczyńska-Moncznik J, **Bzowska M**, Nogieć A, Sroka A, Zarębski M, Vallières L, Guzik K. Rapid externalization of 27-kDa heat shock protein (HSP27) and atypical cell death in neutrophils treated with the sphingolipid analog drug FTY720. *Journal of Leukocyte Biology* **2015** Oct;98(4):591-9.
IF₂₀₁₅ = 4.165, MNiSW₂₀₁₇ = 35, praca cytowana 7 razy

5.4 Wykorzystanie cytometrii przepływowej w badaniach różnorodnych procesów biologicznych

Od początku mojej pracy zawodowej w Zakładzie Immunologii dysponowaliśmy narzędziem badawczym jakim jest cytometr przepływowy. Fakt ten spowodował z jednej strony osiągnięcie przeze mnie relatywnie wysokiej ekspertyzy w obszarze analiz cytometrycznych, a z drugiej stał się przyczynkiem do mniej lub bardziej intensywnej współpracy z różnymi grupami badawczymi, która zaowocowała szeregiem publikacji. Część z nich została pokrótce opisana w tym podrozdziale. We wszystkich wspomnianych poniżej publikacjach moja rola polegała na wykonaniu analiz metodą cytometrii przepływowej oraz konsultacji przy interpretacji uzyskanych wyników.

5.4.1 Analiza ścinania błonowej formy TNF przez enzymy proteolityczne

W pracach **Mężyk et al.** opublikowanych w 2005 roku analizowano udział neutrofilowych enzymów proteolitycznych - elastazy i katepsyny G - oraz protez cysteinowych wytwarzanych przez bakterie *Porphyromonas gingivalis* w ścinaniu z powierzchni komórki błonowej formy cytokiny prozapalnej TNF (mTNF). Proces proteolizy mierzono w oparciu o immunofluorescencyjne znakowanie TNF na powierzchni fibroblastów z następową analizą metodą cytometrii przepływowej. Pokazano, że zarówno gingipainy, elastaza jak i katepsyna G zmniejszają poziom błonowego TNF, przy czym tylko proteolizie mediowanej przez enzymy pochodzące z neutrofilii towarzyszyło gromadzenie się biologicznie czynnego rozpuszczalnego TNF (sTNF) w pożywce hodowlanej. Uzyskane wyniki sugerują, że modulowanie poziomów błonowych i rozpuszczalnych form TNF przez elastazę i katepsynę G może przyczyniać się do prozapalnej aktywności neutrofilii, natomiast wielokierunkowe destrukcyjne działanie gingipain na TNF oraz jego receptory sprzyja rozregulowaniu sieci cytokinowej.

5.4.2 Badania aktywności fagocytarnej

Cytometria przepływowa jest techniką wykorzystywaną między innymi do analiz aktywności fagocytarnej komórek, którym podaje się do pochłaniania obiekty znakowane fluorescencyjnie. Wadą tego typu analiz są trudności w odróżnieniu faktycznego pochłaniania obiektu od jego asocjacji z błoną komórki fagocytującej. Z drugiej strony, w porównaniu do alternatywnej metody analizy jaką jest mikroskopia, cytometria przepływowa oferuje bardzo szybkie tempo analiz, daje możliwość uzyskania dużej ilości danych i jest wygodna w badaniach przesiewowych. W ramach współpracy z zespołem z Zakładu Biofizyki WBBiB UJ cytometria przepływowa zastosowana została do analizy wpływu terapii fotodynamicznych na aktywność fagocytarną komórek nabłonka barwnikowego siatkówki wobec znakowanych fluorescencyjnie membran zewnętrznych segmentów fotoreceptorów lub cząstek obojętnych takich jak kulki polistyrenowe (**Olchawa et al. 2010**).

Jednym z budzących aktualnie duże zainteresowanie obszarów badań biomedycznych jest opracowywanie nanonośników zdolnych do transportu leków w oczekiwane terapeutycznie miejsce z minimalnym wpływem na pozostałe elementy organizmu. W wyniku współpracy z zespołem z Zakładu Biochemii Fizycznej WBBiB UJ, zajmującym się projektowaniem nanonośników zdolnych do transportu leków przeciwpsychotycznych poprzez barierę krew-mózg, powstała publikacja **Lukasiewicz et al. 2017**, której jestem współautorem. Mój wkład polegał na analizie cytometrycznej internalizacji nanokapsulek polimerowych z lekiem klozapiną, różniących się właściwościami fizykochemicznymi takimi jak ładunek, wielkość czy modyfikacja powierzchni, przez ludzkie makrofagi wyprowadzane z monocytów.

5.4.3 Analiza komórek układu odpornościowego u dżdżownic gatunku *Dendrobena veneta*

W Zakładzie Immunologii Ewolucyjnej Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych UJ od wielu lat prowadzone są prace nad mechanizmami odporności wrodzonej u pierścienic. Układ odpornościowy dżdżownic zlokalizowany jest we wtórnej jamie ciała – celomie, gdzie w płynie celomatycznym obecne są liczne komórki odpornościowe – celomocyty. Wśród celomocytów wyróżnia się dwie główne grupy komórek: amebocyty, wykazujące zarówno aktywność fagocytarną jak i przypominającą działanie komórek NK oraz eleocyty (chloragocyty), które syntetyzują i uwalniają między innymi aglutyniny i opsoniny służące do unieruchomienia patogenu. W ziarnistościach eleocytów magazynowana jest ponadto ryboflawina (witamina B2) odpowiedzialna za relatywnie wysoką autofluorescencję tych komórek. U osobników drażnionych mechanicznie lub czynnikami chemicznymi płyn celomatyczny wraz z celomocytami wyrzucany jest przez pory w grzbietowej stronie ciała. Dżdżownice, będące ważnym elementem ekosystemu glebowego, wykorzystuje się jako biologiczne wskaźniki skażenia środowiska i jest to jeden z powodów, dla których mechanizmy odporności u tych bezkręgowców budzą duże zainteresowanie. Współpraca z zespołem prof. dr hab. Barbary Płytycz (Zakład Immunologii Ewolucyjnej, Instytut Zoologii, UJ) zaowocowała dwiema publikacjami z moim współautorstwem. Przy pomocy cytometrii przepływowej wykonałam analizy puli celomocytów u dżdżownic z podziałem na amebocyty i eleocyty oraz przeprowadziłam analizy proliferacji celomocytów barwionych jodkiem propidyny. W kontekście niniejszego autoreferatu na podkreślenie zasługuje fakt, że opublikowane wyniki badań były jednymi z pierwszych dostępnych analiz proliferacji komórek bezkręgowców uzyskanych metodą cytometrii przepływowej, a wdrożone przeze mnie metody pomiaru zostały następnie przejęte przez zespół Zakładu Immunologii Ewolucyjnej i są wykorzystywane oraz udoskonalane już w oparciu o własny sprzęt i nabyte doświadczenie.

Wybrane publikacje związane z tym zagadnieniem:

1. Mężyk-Kopec R, **Bzowska M**, Potempa J, Bzowska M, Jura N, Sroka A, Black RA, Bereta J. Inactivation of membrane tumor necrosis factor alpha by gingipains from *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and Immunity* **2005** 73:1506-14.
IF₂₀₀₅ = 3.933, MNiSW₂₀₁₇ = 40, praca cytowana 47 razy
2. Mężyk-Kopec R, **Bzowska M**, Bzowska M, Mickowska B, Mak P, Potempa J, Bereta J. Effects of elastase and cathepsin G on the levels of membrane and soluble TNFalpha. *Biological Chemistry* **2005** 386:801-11.
IF₂₀₀₅ = 2.577, MNiSW₂₀₁₇ = 25, praca cytowana 17 razy
3. Olchawa E, **Bzowska M**, Sturzenbaum SR, Morgan AJ, Płytycz B. Heavy metals affect the coelomocyte-bacteria balance in earthworms: environmental interactions between abiotic and biotic stressors. *Environ Pollut* **2006** 142:373-81.
IF₂₀₀₆ = 2.769, MNiSW₂₀₁₇ = 40, praca cytowana 37 razy

4. Homa J., **Bzowska M.**, Klimek M., Płytycz B. Flow cytometric quantification of proliferating coelomocytes non-invasively retrieved from the earthworm, *Dendrobena veneta*. *Dev Comp Immunol* **2008** 32:9-14.
IF₂₀₀₈ = 2.833, MNiSW₂₀₁₇ = 40, praca cytowana 20 razy
5. Olchawa M, Szewczyk G, Zareba M, Piłat A, **Bzowska M**, Mikołajczyk T, Sarna T. Sub-lethal photodynamic damage to ARPE-19 cells transiently inhibits their phagocytic activity. *Photochem Photobiol.* **2010** Jul-Aug;86(4):772-80. Epub 2010 May 18.
IF₂₀₁₀ = 2.679, MNiSW₂₀₁₇ = 25, praca cytowana 9 razy
6. Łukasiewicz S, Błasiak E, Szczepanowicz K, Guzik K, **Bzowska M**, Warszyński P, Dziedzicka-Wasylewska M. The interaction of clozapine loaded nanocapsules with the hCMEC/D3 cells - In vitro model of blood brain barrier. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2017** Nov 1;159:200-210
IF₂₀₁₇ = 3.997, MNiSW₂₀₁₇ = 35, praca cytowana 1 raz

6 Literatura

- Baran J, Guzik K, Hryniewicz W, Ernst M, Flad HD, Pryjma J. Apoptosis of monocytes and prolonged survival of granulocytes as a result of phagocytosis of bacteria. *Infect Immun.* 1996, Oct;64(10):4242-8.
- Cecchini P, Tavano R, Polverino de Laureto P, Franzoso S, Mazzon C, Montanari P, Papini E. The soluble recombinant *Neisseria meningitidis* adhesion NadA(.351-405) stimulates human monocytes by binding to extracellular Hsp90. *PLoS One.* 2011; 6(9):e25089.
- Chatterjee A, Dimitropoulou C, Drakopanayiotakis F, Antonova G, Snead C, Cannon J, Venema R C, Catravas J D. Heat shock protein 90 inhibitors prolong survival, attenuate inflammation, and reduce lung injury in murine sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2007 176, 667–675.
- Chen B, Piel W H, Gui L, Bruford E, Monteiro A. The HSP90 family of genes in the human genome: insights into their divergence and evolution. *Genomics* 2005, 86, 627–637.
- Crawford JM, Wilton JM, Richardson P. PMNs die in the gingival crevice periodontal pocket and oral cavity by necrosis and not apoptosis. *J Periodontol.* 2000, 71: 1121–1129.
- Darveau RP, Pham TT, Lemley K, Reife RA, Bainbridge BW, Coats SR, Howald WN, Way SS, Hajjar AM. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4. *Infect Immun.* 2004, 72: 5041–5051.
- Deas DE, Mackey SA, McDonnell HT. Systemic disease and periodontitis: manifestations of neutrophil dysfunction. *Periodontol* 2000. 2003, 32:82-104.
- Desvarieux M, Demmer RT, Rundek T, Boden-Albala B, Jacobs Jr. DR, Sacco LR, Papapanou PN. Periodontal microbiota and carotid intima-media thickness: the Oral Infections and Vascular Disease Epidemiology Study (INVEST). *Circulation* 2005, 111: 576–582.
- Dransfield I, Buckle AM, Savill JS, McDowall A, Haslett C, Hogg N. Neutrophil apoptosis is associated with a reduction in CD16 (Fc gamma RIII) expression. *J Immunol.* 1994, Aug 1;153(3):1254-63.
- Erwig LP, Henson PM. Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ.* 2007, Jun 15;
- Espinola-Klein C, Rupprecht HJ, Blankenberg S, Bickel C, Kopp H, Victor A, Hafner G, Prellwitz W, Schlumberger W, Meyer J. Impact of infectious burden on progression of carotid atherosclerosis. *Stroke.* 2002, Nov;33(11):2581-6.
- Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest.* 1998, Feb 15;101(4):890-8.
- Flannagan RS, Jaumouille V, Grinstein S. The cell biology of phagocytosis. *Annu. Rev. Pathol.* 2012, 7, 61–98.
- Gao Y, Herndon JM, Zhang H, Griffith TS, Ferguson TA. Antiinflammatory effects of CD95 ligand (FasL)-induced apoptosis. *J Exp Med.* 1998, Sep 7;188(5):887-96.

- Gibson 3rd FC, Hong C, Chou HH, Yumoto H, Chen J, Lien E, Wong J, Genco CA. Innate immune recognition of invasive bacteria accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice. *Circulation* 2004, 109: 2801–2806.
- Ginhoux F, Williams M. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity*. 2016, Mar 15;44(3):439-449.
- Grimsley C, Ravichandran KS. Cues for apoptotic cell engulfment: eat-me, don't eat-me and come-get-me signals. *Trends Cell Biol.* 2003, 12;648-56.
- Gordon S, Pludemann A, Mukhopadhyay S. Sinusoidal immunity: macrophages at the lymphohematopoietic interface. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2015, 7, a016378.
- Hashimoto M, Asai Y, Ogawa T. Separation and structural analysis of lipoprotein in a lipopolysaccharide preparation from *Porphyromonas gingivalis*. *International Immunology* 2004, 16: 1431–1437.
- Henson PM, Bratton DL. Recognition and removal of apoptotic cells. In *Phagocyte-pathogen interactions: macrophages and the host response to infection*, D.G. Russell and S. Gordon, eds. (ASM Press) 2009, 341–365.
- Hoffmann PR, de Cathelineau AM, Ogden CA, Leverrier Y, Bratton DL, Daleke DL. Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells. *J Cell Biol.* 2001, 155: 649–659.
- Imamura T. The role of gingipains in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol.* 2003, 74: 111–118.
- Kantarci A, Oyaizu K, Van Dyke TE. Neutrophil-mediated tissue injury in periodontal disease pathogenesis: findings from localized aggressive periodontitis. *J Periodontol.* 2003, Jan;74(1):66-75.
- Krukenberg KA, Street TO, Lavery LA, Agard DA. Conformational dynamics of the molecular chaperone Hsp90. *Q Rev Biophys.* 2011, May;44(2):229-55.
- Kubica M, Guzik K, Koziel J, Zarebski M, Richter W, Gajkowska B, Golda A, Maciag-Gudowska A, Brix K, Shaw L, Foster T, Potempa J. A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: the silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. *PLoS One.* 2008, Jan 9;3(1):e1409.
- Lauber K, Blumenthal S.G, Waibel M, Wesselborg S. Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Mol Cell* 2004, 14:277–287.
- Liu X, Yan Z, Huang L, Guo M, Zhang Z, Guo C. Cell surface heat shock protein 90 modulates prostate cancer cell adhesion and invasion through the integrin-b1/focal adhesion kinase/c-Src signaling pathway. *Oncol. Rep.* 2011, 25;1343–1351.
- Mallat Z, Besnard S, Duriez M, Deleuze V, Emmanuel F, Bureau MF, Soubrier F, Esposito B, Duez H, Fievet C, Staels B, Duverger N, Scherman D, Tedgui A. Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. *Circulation Research* 1999, 85: 17–24.
- Middelhoven PJ, Van Buul JD, Hordijk PL, Roos D. Different proteolytic mechanisms involved in Fc gamma RIIBb shedding from human neutrophils. *Clin Exp Immunol.* 2001, Jul;125(1):169-75.
- Mikołajczyk TP, Skrzeczyńska-Moncznik JE, Zarebski MA, Marewicz EA, Wiśniewska AM, Dzieba M, Dobrucki JW, Pryjma JR. Interaction of human peripheral blood monocytes with apoptotic polymorphonuclear cells. *Immunology.* 2009, Sep;128(1):103-13.
- Miyasaki KT. The neutrophil: mechanisms of controlling periodontal bacteria. *J Periodontol.* 1991, Dec;62(12):761-74.
- Neckers L, Trepel JB. Stressing the development of small molecules targeting HSP90. *Clin Cancer Res.* 2014, Jan 15;20(2):275-7.
- Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood.* 1989 Nov 15;74(7):2527-34.
- Penberthy KK, Ravichandran KS. Apoptotic cell recognition receptors and scavenger receptors. *Immunol. Rev.* 2016, 269, 44–59.

- Pfeiffer A, Böttcher A, Orsó E, Kapinsky M, Nagy P, Bodnár A, Spreitzer I, Liebisch G, Drobnik W, Gempel K, Horn M, Holmer S, Hartung T, Multhoff G, Schütz G, Schindler H, Ulmer AJ, Heine H, Stelter F, Schütt C, Rothe G, Szöllösi J, Damjanovich S, Schmitz G. Lipopolysaccharide and ceramide docking to CD14 provokes ligand-specific receptor clustering in rafts. *Eur J Immunol.* 2001, Nov;31(11):3153-64.
- Pillay I, Nakano H, Sharma SV. Radicol inhibits tyrosine phosphorylation of the mitotic Src substrate Sam68 and retards subsequent exit from mitosis of Src-transformed cells. *Cell Growth Differ.* 1996, 7, 1487–1499.
- Potteaux S, Esposito B, van Oostrom O, Brun V, Ardouin P, Groux H, Tedgui A, Mallat Z. Leukocyte-derived interleukin 10 is required for protection against atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2004, 24: 1474–1478.
- Pratt WB, Toft DO. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med (Maywood).* 2003, Feb;228(2):111-33.
- Rabinovitch M. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol.* 1995 Mar;5(3):85-7.
- Roe SM, Prodromou C, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH. Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicol and geldanamycin. *J. Med. Chem.* 1999, 42, 260–266.
- Rothlin CV, Lemke G. TAM receptor signaling and autoimmune disease. *Curr. Opin. Immunol.* 2010, 22, 740–746.
- Röhl A, Rohrberg J, Buchner J. The chaperone Hsp90: changing partners for demanding clients. *Trends Biochem Sci.* 2013, May;38(5):253-62.
- Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol* 2002, 2:965–975.
- Schaaf B, Luitjens K, Goldmann T, van Bremen T, Sayk F, Dodt C, Dalhoff K, Droemann D. Mortality in human sepsis is associated with downregulation of Toll-like receptor 2 and CD14 expression on blood monocytes. *Diagnostic Pathology* 2009, 4: 12.
- Shimp III SK, Parson CD, Regna NL, Thomas AN, Chafin CB, Reilly CM, Nichole Rylander M. HSP90 inhibition by 17-DMAG reduces inflammation in J774 macrophages through suppression of Akt and nuclear factor-κB pathways. *Inflamm. Res.* 2012, 61: 521–533.
- Sidera K, Gaitanou M, Stellas D, Matsas R, Patsavoudi E. A critical role for HSP90 in cancer cell invasion involves interaction with the extracellular domain of HER-2. *J. Biol. Chem.* 2008, 283, 2031–2041.
- Skrzeczyńska J, Kobylarz K, Hartwich Z, Zembala M, Pryjma J. CD14+CD16+ monocytes in the course of sepsis in neonates and small children: monitoring and functional studies. *Scand J Immunol.* 2002, Jun;55(6):629-38.
- Skrzeczyńska-Moncznik J, Bzowska M, Loseke S, Grage-Griebenow E, Zembala M, Pryjma J. Peripheral blood CD14^{high} CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. *Scand J Immunol.* 2008, Feb;67(2):152-9.
- Skrzeczyńska-Moncznik J, Bzowska M, Nogiec A, Sroka A, Zarebski M, Vallières L, Guzik K. Rapid externalization of 27-kDa heat shock protein (HSP27) and atypical cell death in neutrophils treated with the sphingolipid analog drug FTY720. *J Leukoc Biol.* 2015, Oct;98(4):591-9.
- Söder PO, Söder B, Nowak J, Jogestrand T. Early carotid atherosclerosis in subjects with periodontal diseases. *Stroke* 2005, 36: 1195–1200.
- Stuart LM, Ezekowitz RA. Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity.* 2005, May;22(5):539-50.
- Taipale M, Jarosz DF, Lindquist S. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010, 11, 515–528.
- Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol.* 2005 Jan;17(1):1-14.
- Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiological Reviews* 2006, 86: 515–581.
- Triantafilou K, Triantafilou M, Dedrick RL. A CD14- independent LPS receptor cluster. *Nat. Immunol.* 2001, 2:338–345.

Triantafilou M, Miyake K, Golenbock DT, Triantafilou K. Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *J. Cell Sci.* 2002, 115:2603–2611.

Triantafilou M, Triantafilou K. Heat-shock protein 70 and heat-shock protein 90 associate with Toll-like receptor 4 in response to bacterial lipopolysaccharide. *Biochem Soc Trans.* 2004 Aug;32(Pt 4):636-9.

Triantafilou M, Gamper FG, Lepper PM, Mouratis MA, Schumann C, Harokopakis E, Schifferle RE, Hajishengallis G, Triantafilou K. Lipopolysaccharides from atherosclerosis-associated bacteria antagonize TLR4, induce formation of TLR2/1/ CD36 complexes in lipid rafts and trigger TLR2-induced inflammatory responses in human vascular endothelial cells. *Cellular Microbiology* 2007, 9:2030–2039.

Triantafilou M, Lepper PM, Olden R, Dias IS, Triantafilou K. Location, location, location: is membrane partitioning everything when it comes to innate immune activation? *Mediators of Inflammation* 2011, 2011:186093.

Tsutsumi S, Neckers L. Extracellular heat shock protein 90: a role for a molecular chaperone in cell motility and cancer metastasis. *Cancer Sci.* 2007, 98, 1536–1539.

van Haelst PL, Tervaert JW, Bijzet J, Baljé-Volkers C, May JF, Langeveld B, Gans RO. Circulating monocytes in patients with acute coronary syndromes lack sufficient interleukin-10 production after lipopolysaccharide stimulation. *Clin Exp Immunol.* 2004, Nov;138(2):364-8.

Vandivier RW, Fadok VA, Hoffmann PR, Bratton DL, Penvari C, Brown KK et al. Elastase mediated phosphatidylserine receptor cleavage impairs apoptotic cell clearance in cystic fibrosis and bronchiectasis. *J Clin Invest* 2002, 109:661–670.

Wiedermann CJ, Kiechl S, Dunzendorfer S, Schratzberger P, Egger G, Oberhollenzer F, Willeit J. Association of endotoxemia with carotid atherosclerosis and cardiovascular disease: prospective results from the Bruneck Study. *J Am Coll Cardiol.* 1999, Dec;34(7):1975-81.

