Autoreferat przedstawiający opis dorobku i osiągnięć naukowych

Dr Joanna Kozieł (z d. Kania)
Zakład Mikrobiologii,
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii,
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

1. **Imię i nazwisko:** Joanna Kozieł (z d. Kania)
2. **Posiadane dyplomy i stopnie naukowe:**

2000	magister biologii ze specjalnością biologia molekularna, Uniwersytet Jagielloński, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Tytuł pracy magisterskiej: „Czynnik transkrypcyjny NFκB – kluczowy element przekazu sygnału w odpowiedzi zapalnej" Promotor: dr hab. Amalia Guzdek
2004	doktor biochemii, Uniwersytet Jagielloński, Wydział Biotechnologii Tytuł rozprawy doktorskiej: „Zmiany ekspresji genów w infekcji *Helicobacter pylori* i raku żołądka" Promotorzy: dr hab. Amalia Guzdek oraz prof. dr hab. Piotr Konturek

3. **Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych:**

2001-2002	pracownik naukowy, Departament Medycyny, Uniwersytet Erlangen-Norymberga, Niemcy
2004-2006	asystent, Zakład Mikrobiologii, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński
2006 - obecnie	adiunkt, Zakład Mikrobiologii, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński

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. nr 65, poz. 595 ze zm.):**

4.a. tytuł osiągnięcia naukowego:

Identyfikacja i analiza wybranych strategii osłabienia aktywności antybakteryjnej makrofagów przez bakterie patogenne

4.b. (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa):

1. Bryzek D, Ksiazek M, Bielecka E, Karim AY, Potempa B, Staniec D, **Koziel J*#**, Potempa J. A pathogenic trace of *Tannerella forsythia* - shedding of soluble fully active tumor necrosis factor α from the macrophage surface by karilysin. Mol Oral Microbiol. 2014 Dec;29(6):294-306.

*autor korespondencyjny
#eq. senior autor

2. **Koziel J***, Karim AY, Przybyszewska K, Ksiazek M, Rapala-Kozik M, Nguyen KA, Potempa J. Proteolytic inactivation of LL-37 by karilysin, a novel virulence mechanism of *Tannerella forsythia*. J Innate Immun. 2010;2(3):288-93.

*autor korespondencyjny

3. **Koziel J***, Bryzek D, Sroka A, Maresz K, Glowczyk I, Bielecka E, Kantyka T, Pyrć K, Svoboda P, Pohl J, Potempa J. Citrullination Alters Immunomodulatory Function of LL-37 Essential for Prevention of Endotoxin-Induced Sepsis. J Immunol. 2014 Jun 1;192(11):5363-72.

*autor korespondencyjny

4. **Koziel J***, Mydel P, Potempa J. The link between periodontal disease and rheumatoid arthritis: an updated review. Curr Rheumatol Rep. 2014 Mar;16(3):408.

*autor korespondencyjny

5. 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.

*autor korespondencyjny

6. **Koziel J***, Kmiecik K, Chmiest D, Maresz K, Mizgalska D, Maciag-Gudowska A, Mydel P, Potempa J. The role of Mcl-1 in *S. aureus*-induced cytoprotection of infected macrophages. Mediators Inflamm. 2013;2013:427021.

*autor korespondencyjny

7. **Koziel J***, Chmiest D, Bryzek D, Kmiecik K, Mizgalska D, Maciag-Gudowska A, Shaw LN, Potempa J. The Janus Face of α-Toxin: A Potent Mediator of Cytoprotection in Staphylococci-Infected Macrophages. J Innate Immun. 2015 ;7(2):187-98.

*autor korespondencyjny

8. Blazusiak E, Florczyk D, Jura J, Potempa J, **Koziel J***. Differential regulation by Toll-like receptor agonists reveals that MCPIP1 is the potent regulator of innate immunity in bacterial and viral infections. J Innate Immun. 2013;5(1):15-23.

*autor korespondencyjny

4.c. Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

W niniejszej części przedstawione zostały główne tezy oraz wyniki osiągnięcia naukowego, stanowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego, zatytułowanego „**Identyfikacja i analiza wybranych strategii osłabienia aktywności antybakteryjnej makrofagów przez bakterie patogenne**”. Pełna lista opublikowanych prac oraz dane bibliometryczne zawarte została w **Załączniku 3a** (Wykaz opublikowanych prac naukowych lub twórczych prac zawodowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki).

Temat:
Identyfikacja i analiza wybranych strategii osłabienia aktywności antybakteryjnej makrofagów przez bakterie patogenne.

Wprowadzenie i cel naukowy:
Pierwszą linią obrony organizmu ludzkiego skierowaną przeciw drobnoustrojom chorobotwórczym jest nieswoista, wrodzona odpowiedź immunologiczna. Przełamanie tej zwykle bardzo skutecznej linii obrony przez patogen nie oznacza jednak rozwoju infekcji, ponieważ układ immunologiczny organizmu uruchamia drugi nabyty, swoisty dla danego intruza system obrony. Obydwa systemy ściśle ze sobą współpracują i na ogół ostatecznie prowadzą do skutecznej eliminacji drobnoustroju chorobotwórczego. Niekiedy jednak ten wyspecjalizowany mechanizm obronny zawodzi. Częstą przyczyną jest nabyta osobnicza immunosupresja, będąca skutkiem chemioterapii, radioterapii, bądź wrodzone upośledzenie działania układu immunologicznego związane z tłem genetycznym osobnika, którego przykładem są neutropenia, przewlekłe choroby ziarniniakowe, czy deficyty układu dopełniacza [1-5]. Drugim powodem nieskuteczności mechanizmów obronnych zainfekowanego organizmu jest specyficzna i często wysoce wyrafinowana strategia wirulencji patogenu. Wirulencja jest procesem dynamicznym, napędzanym od tysięcy lat koewolucją organizmu ludzkiego z drobnoustrojami. Konsekwencją wprowadzenia do leczenia chorób infekcyjnych antybiotyków doprowadziło do szybkich adaptacyjnych zmian u bakterii w postaci nabytej oporności na kolejne antybiotyki stosowane w lecznictwie. Przykładowo, analiza zakażeń wewnątrzszpitalnych w USA wykazała wzrost przypadków zakażeń opornymi na metycylinę szczepami gronkowca złocistego (ang. *methicyllin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) z 22% w roku 1995 do 57% w 2001 [6]. Stosowanie obecnych na rynku antybiotyków prowadzi nie tylko do selekcji lekoopornych szczepów patogennych bakterii, ale również do zaburzenia homeostazy naturalnej mikroflory organizmu ludzkiego. Poczynione w ostatnich latach analizy mikrobiomu dowiodły, że zmiana spektrum flory bakteryjnej w organizmie ludzkim może skutkować podatnością osobnika na inne choroby, niekoniecznie o podłożu infekcyjnym [7-10]. Wśród schorzeń, do których rozwoju przyczynia się zaburzenie homeostazy flory bakteryjnej wywołanej nadmiernym stosowaniem antybiotyków są poważne choroby systemowe i autoimmunologiczne, jak reumatoidalne zapalenie stawów (RZS), cukrzyca, czy zespół jelita wrażliwego (IBD) [11-14]. Powyższe dane jednoznacznie wskazują na konieczność modyfikacji i udoskonalenia terapii antybakteryjnej. Drogą do jej zaprojektowania jest m.in. poznawanie nieodkrytych dotychczas strategii patogenności lub nowo powstałych adaptacji patogenu do przetrwania w zainfekowanym organizmie. Identyfikacja tych mechanizmów i ich charakterystyka na molekularnym poziomie umożliwi stworzenie precyzyjnego narzędzia, które wyeliminuje konkretny patogen bez skutków ubocznych dla organizmu. Dzięki temu zmniejszona zostanie ingerencja leku w naturalną mikroflorę organizmu ludzkiego, co zminimalizuje naruszenie struktury gatunkowej naturalnego, komensalnego mikrobiomu, a tym samym zmniejszy ryzyko rozwoju wtórnych schorzeń. Choć ostatecznie ocena działania układu odpornościowego w odpowiedzi na patogen wymaga kompleksowego podejścia badawczego, to u podstaw tych badań stoi zdefiniowanie roli i ewentualnych zaburzeń funkcjonowania poszczególnych komponent obrony immunologicznej. Makrofagi stanowią jeden z nich, kluczowy w regulacji procesu rozpoznawania i eliminacji patogenów oraz komunikacji z pozostałymi gałęziami systemu odporności, w tym komórkami immunologicznymi. Rolę makrofagów w procesie infekcji potwierdza rozwój przewlekłych chorób ziarniniakowych mających miejsce

w przypadku dysfunkcji tych fagocytów [15]. Ponadto wielokrotnie dowiedziono, że modulacja fizjologicznej funkcji makrofagów ma reperkusje systemowe. Ma to miejsce w przypadku infekcji wywołanych przez obligatoryjnie wewnątrzkomórkowe patogeny (bakterie, wirusy, parazyty), jak również w kontekście chorób nieinfekcyjnych, takich jak otyłość, czy procesy nowotworowe [16-18].

Z powyższych względów głównym celem prac będących podstawą mojego postępowania habilitacyjnego była identyfikacja i kompleksowa, molekularna analiza wybranych strategii inaktywacji makrofagów, wynikających z bezpośredniego działania patogenów na te komórki lub na immunomodulatory determinujące prawidłowe funkcjonowanie makrofagów, takie jak: peptydy antybakteryjne i cytokiny. W cyklu prowadzonych prac podjęto próbę **identyfikacji i analizy poniżej wyszczególnionych bezpośrednich i pośrednich strategii osłabienia aktywności antybakteryjnej makrofagów podczas infekcji bakteryjnych**.

1. Strategia pośrednia - modyfikacja czynników zewnątrzkomórkowych pełniących rolę immunomodulacyjną dla makrofagów, w tym:

- **1.1. Potranslacyjna modyfikacja immunomodulatorów regulujących fizjologiczne funkcje makrofagów przez enzymy proteolityczne patogenów.**
- **1.2. Cytrulinacja białek o charakterze immunomodulacyjnym, jako następstwo septycznego stanu zapalnego i konsekwencje tego procesu dla prawidłowego funkcjonowania makrofagów.**

2. Strategia bezpośrednia – modyfikacja makrofagów, w tym:

- **2.1. Zdefiniowanie cech i funkcji biologicznych makrofagów stanowiących niszę ekologiczną patogenów fakultatywnie wewnątrzkomórkowych.**
- **2.2. Modyfikację ekspresji regulatorów stanu zapalnego o dominującej roli w leukocytach pod wpływem patogenów i ich determinant wirulencji oraz wpływ tego procesu na fizjologię makrofagów.**

Badania przeze mnie prowadzone miały charakter badań podstawowych i prowadzone były z wykorzystaniem modelu pierwotnych makrofagów ludzkich lub mysich. Wybrane modele badawcze zostały zaprojektowane tak, aby nawiązywać do konkretnych infekcji bakteryjnych, w których rola makrofagów została jednoznacznie udowodniona. Badania nawiązywały do chorób występujących z dużą częstością w populacji ludzkiej (w tym: infekcje gronkowcowe i paradontoza) lub występujących rzadziej, ale zagrażających życiu (stan septyczny). Są to choroby, których etiologia nadal nie została jednoznacznie zdefiniowana lub terapia stosowana w ich leczeniu opiera się na lekach o niewystarczającej skuteczności.

Opis wyników prowadzonych badań:

1. Strategia pośrednia - modyfikacja czynników zewnątrzkomórkowych pełniących rolę immunomodulacyjną dla makrofagów, w tym:

1.1. Potranslacyjna modyfikacja immunomodulatorów regulujących fizjologiczne funkcje tych komórek, katalizowana enzymami proteolitycznymi patogenów.

Bryzek D, Ksiazek M, Bielecka E, Karim AY, Potempa B, Staniec D, **Koziel J**, Potempa J. A pathogenic trace of *Tannerella forsythia* - shedding of soluble fully active tumor necrosis factor α from the macrophage surface by karilysin. *Mol Oral Microbiol*. 2014 Dec;29(6):294-306.

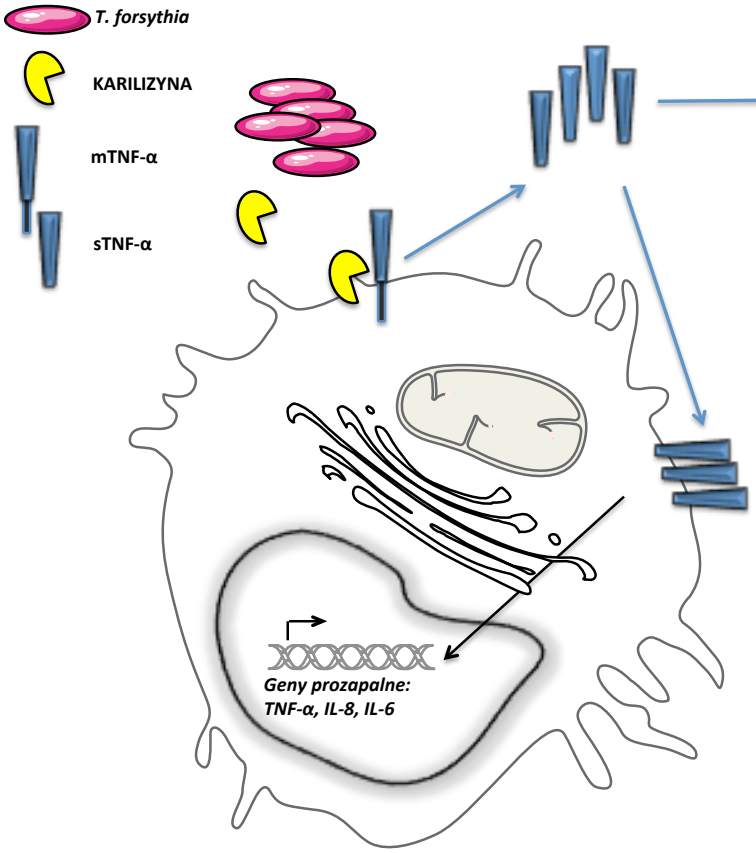
Koziel J, Karim AY, Przybyszewska K, Ksiazek M, Rapala-Kozik M, Nguyen KA, Potempa J. Proteolytic inactivation of LL-37 by karilysin, a novel virulence mechanism of *Tannerella forsythia*. *J Innate Immun*. 2010;2(3):288-93.

Mechanizmy wirulencji patogenów bazują wielokrotnie na ekspresji czynników inaktywujących lub modulujących prawidłowe działanie komórek immunologicznych. Powszechnie znanym przykładem takich czynników są toksyny bakteryjne, czy enzymy. Wśród enzymów kluczową rolę zajmują proteazy, których potencjalne spektrum działania jest bardzo szerokie i obejmuje receptory powierzchniowe komórek immunologicznych oraz mediatory komunikacji międzykomórkowej [19]. Ponieważ jednoznacznie dowiedziono, że proteazy bakteryjne promują rozwój zapalenia przyzębia, stąd swoje badania skoncentrowałam na bakteriach odpowiedzialnych za rozwój paradontozy [20].

Zapalenie przyzębia, powszechnie określane mianem paradontozy, to proces chorobowy, którego etiologii dopatruje się w zmianie mikroflory kolonizującej powierzchnię szkliwa i odsłoniętych korzeni zębów. Bakterie Gram-dodatnie, stanowiące główny składnik prawidłowej mikroflory jamy ustnej zostają wyparte przez gatunki beztlenowych bakterii Gram-ujemnych. Te ostatnie, tworząc biofilm gromadzący się w bruździe dziąsłowej, indukują patologiczne zmiany manifestujące się utworzeniem kieszonek dziąsłowych będących wynikiem degradacji włókien więzadeł przyzębia i resorpcji kości wyrostka zębodołowego. W przypadkach zaawansowanej paradontozy te patologiczne zmiany prowadzą do utraty zęba [21,22]. Uszkodzenie tkanek przyzębia jest skutkiem zarówno bezpośredniego działania drobnoustrojów, jak i nadmiernej aktywacji mechanizmów obrony immunologicznej rekrutowanych w odpowiedzi na patogen [23-29]. Drobnoustroje, których rolę uznaje się za dominującą w rozwoju schorzenia, tj. *Porphyromonas gingivalis, Tannerella forsythia* i *Treponema denticola* określono mianem „czerwonego kompleksu" (ang. *red complex*) [30]. Spośród trzech wymienionych patogenów, *T. forsythia* jest drobnoustrojem, którego mechanizmy patogenności są praktycznie nieznane [31]. Z tego względu rozpoczęłam badania, które miały określić rolę proteazy sekrecyjnej *T. forsythia* – karilizyny - w zaburzeniu funkcjonowania mechanizmów obrony nieswoistej, w szczególności makrofagów.

Właściwe funkcjonowanie komórek układu immunologicznego jest regulowane m.in. produkcją cytokin. Z tego względu mediatory te stanowią doskonały cel dla patogenów, które na tej drodze egzekwują zmiany funkcjonowania kolejnych mechanizmów immunologicznych. Makrofagi są populacją komórek, które cechuje bardzo wysoka ekspresja czynnika martwicy nowotworu (TNF-α) indukowana w odpowiedzi na rozpoznanie patogenów. Czynnik ten uważany jest za jeden z głównych mediatorów stanu zapalnego.

TNF-α wykazuje działanie plejotropowe i uruchamia różnorodne ścieżki przekazu sygnału, w tym prowadzące do eliminacji intruza poprzez zwiększenie przepuszczalności naczyń krwionośnych, co umożliwia naciek neutrofili i białek surowicy do miejsca infekcji [32]. Z drugiej strony, z nadmierną ekspresją TNF-α wiąże się patogenezę chronicznych chorób zapalnych, w tym paradontozy. Dowiedziono, że TNF-α indukuje proces resorpcji kości mediowany aktywacją osteoklastów oraz degradację białek macierzy zewnątrzkomórkowej w wyniku nadmiernej produkcji i aktywacji metaloproteaz (MMP-1, 2, 9) [33]. W związku z powyższym, czynniki wpływające na regulację ekspresji i funkcji tej cytokiny wydają się być kluczowe dla rozwoju paradontozy. Moje badania dowiodły, że karilizyna katalizuje proces proteolitycznej modyfikacji transbłonowej formy TNF-α prowadząc tym samym do uwolnienia rozpuszczalnej formy tej cytokiny. Choć uwolniona forma cytokiny jest częściowo degradowana, to jednak pozostaje biologicznie aktywna. Jej uwolnienie z powierzchni makrofagów pod wpływem karilizyny skutkuje bowiem indukcją apoptozy oraz autokrynnej indukcji ekspresji *de novo* cytokin prozapalnych (m.in. IL-8, IL-6) (Rycina 1) [**Bryzek *et al.*, 2014**].

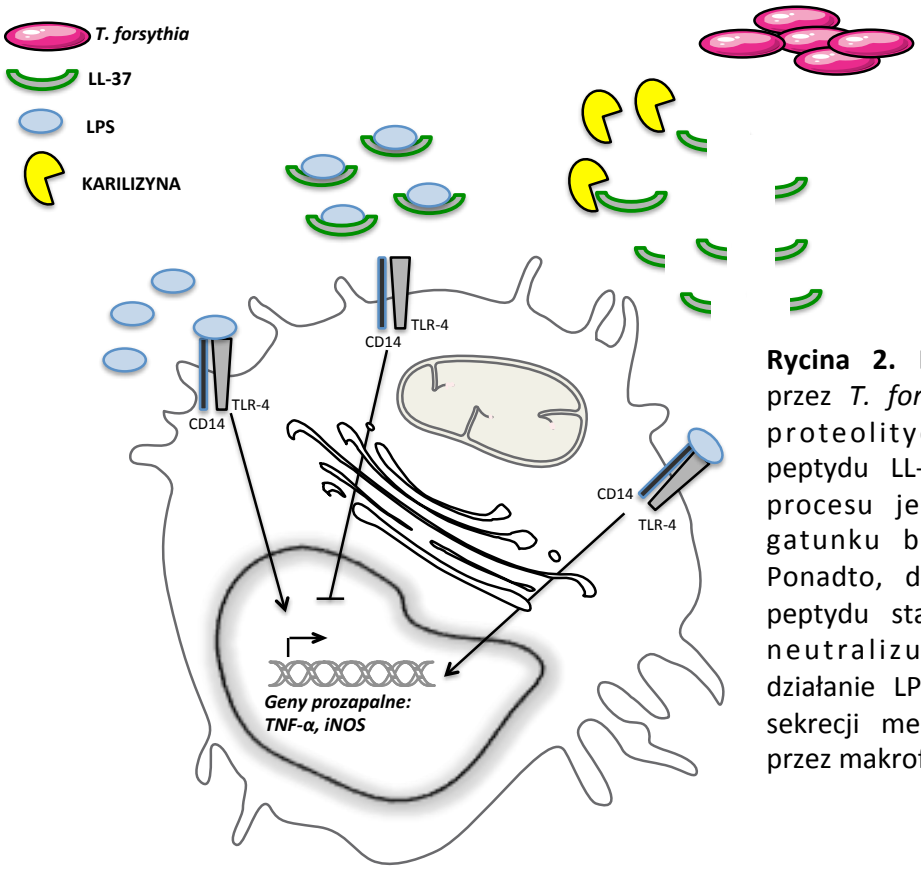


Rycina 1. Karilizyna produkowana przez *T. forsythia* katalizuje uwalnianie rozpuszczalnej formy TNF-α, która będąc biologicznie aktywna prowadzi do indukcji apoptozy komórek nabłonkowych, a działając zwrotnie na makrofagi prowadzi do indukcji mediatorów stanu zapalnego (cytokiny, NO). Rycina została oparta na prezentowanej w publikacji Bryzek *et al*., 2014. Niniejsza rycina, podobnie jak wszystkie pozostałe wykonano przy użyciu Servier Medical Art.

Dowiedziono, że potencjalne miejsca proteolizy błonowej formy TNF-α przez karilizynę (Ala76-Val77) pokrywają się z miejscami proteolizy wyznaczonej dla sekretazy ADAM17 (TACE – ang. *TNF-α converting enzyme*). W ten sposób, karilizyna naśladuje działanie sekretazy ADAM17, która w warunkach fizjologicznych odpowiada za proces uwalniania formy rozpuszczalnej z powierzchni makrofagów [34, 35]. Jednocześnie badania prowadzone przeze mnie dowiodły, że wydajność uwalniania TNF-α jest porównywalna dla wszystkich znanych form karilizyny (Kly48, Kly38 or Kly18), a cały proces jest niezależny od

TACE [**Bryzek *et al.*, 2014**]. Chociaż generacja TNF-α jest kluczowa we właściwej obronie organizmu w odpowiedzi na patogen, to dowiedziono, że nadmierne wydzielanie aktywnej formy tej cytokiny przyczynia się do zaostrzenia objawów stanu zapalnego przyzębia. Teza ta została podparta obserwacjami polepszenia stanu zdrowia u pacjentów, którym aplikowano antagonistów TNF-α [36]. Z powyższych względów **odkrycie roli karilizyny w uwalnianiu TNF-α, które stało się moim udziałem, może być rozpatrywane jako nowo poznana strategia wirulencji *T. forsythia* prowadząca do deregulacji wzajemnych oddziaływań sieci cytokin produkowanych przez makrofagi, a tym samym do intensyfikacji stanu zapalnego, co promuje uszkodzenie tkanek**.

Modyfikacja działania układu immunologicznego gospodarza po wpływem proteaz bakteryjnych periodontopatogenów nie ogranicza się jedynie do sieci cytokin. Popularną taktyką stosowaną przez patogeny przyzębia jest modyfikacja enzymatyczna peptydów antybakteryjnych prowadząca do zmian w ich aktywności biologicznej [37]. Moje badania dowiodły, że ludzki peptyd LL-37 (katelicydyna) jest wydajnie inaktywowany w wyniku proteolitycznej degradacji przez karilizynę [**Koziel *et al.*, 2010**]. Modyfikacja ta skutkuje utratą funkcji bakteriobójczych LL-37 i stanowi tym samym wyjaśnienie opisanej oporności *T. forsythia* na badany peptyd [38]. Należy zaznaczyć, że modyfikacja ta może mieć szerszy zasięg, gdyż obecność karilizyny w miejscu toczącej się infekcji może chronić inne gatunki patogenów wrażliwych na działanie katelicydyny. Z tego względu ta potranslacyjna modyfikacja peptydów antybakteryjnych będąca skutkiem działaniem proteaz i drastycznie zmieniająca fizjologiczne funkcje AMPs (ang. *antimicrobial peptides*) jest strategią wirulencji powszechnie stosowaną przez patogeny kolonizujące skórę oraz powierzchnie śluzówek [39]. Badany peptyd LL-37 cechuje plejotropizm działania, a jedną z jego funkcji jest inaktywacja prozapalnych właściwości endotoksyny bakteryjnej (LPS). Prowadzone przeze mnie prace dowiodły, że modyfikacja proteolityczna LL-37 prowadzi nie tylko do zniesienia interakcji peptydu z LPS, ale także sprzyja uwalnianiu aktywnej endotoksyny z kompleksu LPS/LL-37 [**Koziel *et al.*, 2010**]. W ten sposób w obecności karilizyny, LPS nie jest neutralizowany przez LL-37 i indukuje silną sekrecję mediatorów zapalnych przez makrofagi (Rycina 2).



Rycina 2. Ekspresja karilizyny przez *T. forsythia* prowadzi do proteolitycznej degradacji peptydu LL-37. Skutkiem tego procesu jest oporność tego gatunku bakterii na LL-37. Ponadto, degradacja LL-37 – peptydu stanowiącego czynnik neutralizujący prozapalne działanie LPS wzmaga indukcję sekrecji mediatorów zapalnych przez makrofagi.

Podsumowując, badania te dowiodły, że karilizyna poprzez inaktywację bakteriobójczych funkcji LL-37 sprzyja kolonizacji *T. forsythia*. Ponadto utrata zdolności do neutralizacji LPS przez zdegradowany LL-37 potwierdza opisaną powyżej rolę karilizyny, jako nowo odkrytego czynnika wirulencji promującego indukcję stanu zapalnego w czasie rozwoju paradontozy.

1.2. Cytrulinacja, jako następstwo septycznego stanu zapalnego i konsekwencja tego procesu dla prawidłowego funkcjonowania makrofagów

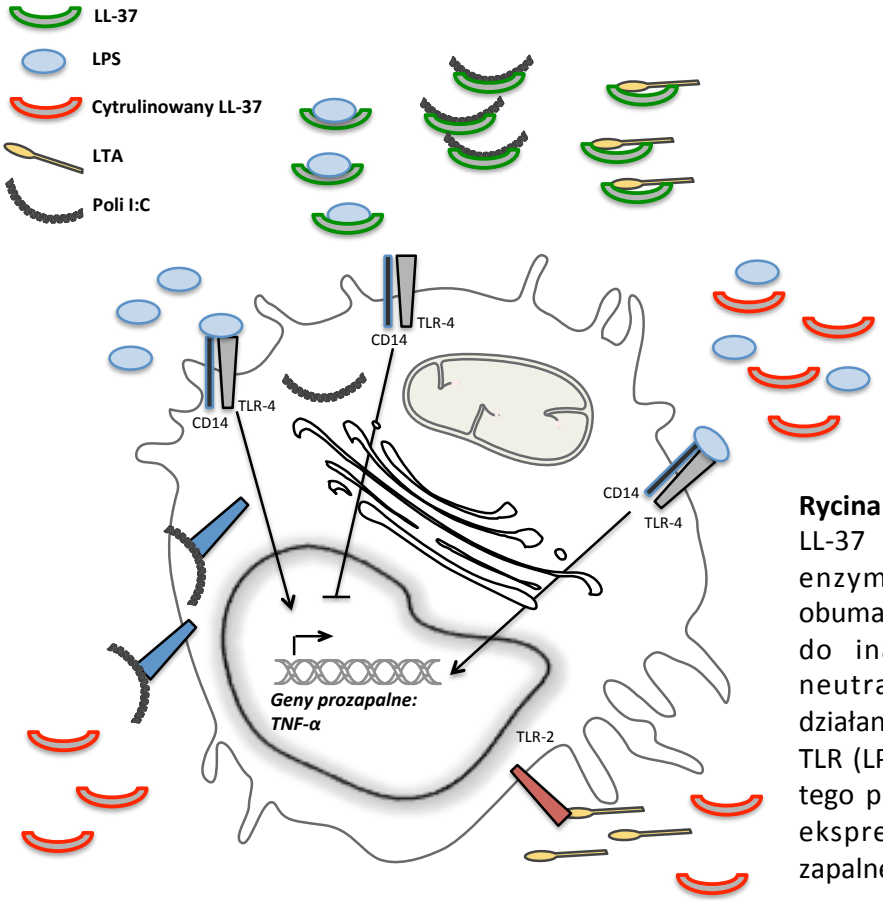
Koziel J, Bryzek D, Sroka A, Maresz K, Glowczyk I, Bielecka E, Kantyka T, Pyrć K, Svoboda P, Pohl J, Potempa J. Citrullination Alters Immunomodulatory Function of LL-37 Essential for Prevention of Endotoxin-Induced Sepsis. *J Immunol*. 2014 Jun 1;192(11):5363-72.

Koziel J, Mydel P, Potempa J. The link between periodontal disease and rheumatoid arthritis: an updated review. *Curr Rheumatol Rep*. 2014 Mar;16(3):408.

Zmiana funkcji i efektu działania immunomodulatorów może być nie tylko konsekwencją bezpośredniego działania enzymów produkowanych przez drobnoustrój, ale również efektem aktywności enzymów gospodarza. Zmiana ekspresji enzymów lub ich aktywności towarzyszy rozwojowi stanu zapalnego, będącego konsekwencją infekcji bakteryjnej [40, 41]. **Moje badania zakładały więc identyfikację modyfikacji potranslacyjnych katalizowanych przez enzymy gospodarza mające wpływ na funkcjonowanie makrofagów i dalszy rozwój stanu zapalnego**. Prowadzone badania

dowiodły, że proces enzymatycznej deiminacji argininy w białkach surowicy przez deiminazy peptydyloargininowe (ang. *peptidylarginine deiminase*, PAD) ulega intensyfikacji podczas rozwoju stanu septycznego, uogólnionej reakcji zapalnej [**Koziel *et al.*, 2014**]. Obserwacje te zostały poczynione na podstawie wyników badań na mysim modelu sepsy endotoksynowej, a następnie potwierdzone na próbkach surowicy pobranych od pacjentów ze zdiagnozowanym stanem septycznym, w których aktywność PAD koreluje z ilością białek cytrulinowanych. Postulujemy, że cytrulinacja białek zewnątrzkomórkowych, czy białek surowicy jest najprawdopodobniej konsekwencją uwolnienia PAD z przedziałów wewnątrzkomórkowych, mającą miejsce podczas uszkodzenia komórek w stanie zapalnym [42, 43]. Do swoich dalszych badań, jako model wykorzystałam peptyd antybakteryjny LL-37, który jest obecny w surowicy, a wzrost stężenia peptydu w stanie zapalnym został wielokrotnie opisany [44, 45]. W prowadzonych badaniach dowiodłam, że LL-37 jest jednym z substratów dla PADs, które u człowieka występują w pięciu formach i różnej lokalizacji tkankowej [46, 47]. W liniowej strukturze tego peptydu obecnych jest 5 reszt argininy, które ulegają wydajnej cytrulinacji pod wpływem PAD-2 i -4 obecnych w komórkach immunologicznych. Wykazałam, że deiminacja reszt argininowych w peptydzie LL-37 katalizowana przy udziale tych enzymów prowadzi do powstania mieszaniny zmodyfikowanych peptydów o zróżnicowanej liczbie reszt cytruliny [**Koziel *et al.*, 2014**]. Kationowy charakter peptydu uwarunkowany obecnością reszt argininy i lizyny warunkuje funkcje biologiczne LL-37, co tłumaczy dlaczego cytrulinacja modyfikuje aktywność peptydu. Jedną z funkcji LL-37 jest wiązanie LPS czego przejawem jest osłabienie rozpoznawania endotoksyny przez komórki posiadające receptor TLR-4, w tym makrofagi, co neutralizuje prozapalne działanie LPS [48]. Moje badania wykazały, że modyfikowany peptyd jest w tym procesie 40 razy mniej wydajny niż natywny. Jest to konsekwencją spadku powinowactwa peptydu do endotoksyny bakteryjnej [**Koziel *et al.*, 2014**]. Celem weryfikacji roli zaobserwowanego zjawiska w organizmie żywym, w swoich badaniach zastosowałam model *in vivo* systemowej reakcji zapalnej indukowanej endotoksyną bakteryjną, który potwierdził spadek protekcyjnej funkcji cytrulinowanego LL-37 względem LPS. Deiminacja LL-37 niweluje zatem protekcyjne działanie LL-37, chroniące przed rozwojem sepsy endotoksynowej, która odzwierciedla ostre stany zapalne indukowane zakażeniem drobnoustrojami Gram–ujemnymi [49]. W swoich badaniach udowodniłam ponadto, że modyfikacja ta nie ogranicza się jedynie do modulacji w makrofagach przekazu sygnału indukowanego LPS, bowiem cytrulinowany peptyd LL-37 przestaje pełnić swoją neutralizującą rolę również względem pozostałych agonistów receptorów TLR, tj. kwasu lipotejchojowego (LTA) i dwuniciowego RNA (poly I:C) (Rycina 3) [**Koziel *et al.*, 2014**]. Ponieważ LL-37 ma wielokierunkowe działanie immunomodulacyjne, to proces deiminacji reszt argininy tego peptydu przez ludzkie enzymy PAD może mieć szersze znaczenie w regulacji funkcjonowania układu immunologicznego podczas infekcji [50, 51]. Z tego względu kontynuuję ten temat badawczy i obecnie prowadzę prace, które mają na celu wprowadzenie nowych technik oceny ilościowej i jakościowej cytrulinowanych białek w płynach fizjologicznych. Ponadto planuję wykorzystanie specyficznych inhibitorów PAD, jako potencjalnych terapeutyków, których działanie zostanie ocenione na zoptymalizowanym w moich dotychczasowych badaniach mysim modelu sepsy. **Dotychczas uzyskane wyniki moich badań wskazują, że nasilenie modyfikacji potranslacyjnych, będących skutkiem infekcji, odgrywa istotną rolę w zmianie wyjściowych funkcji cząstek immunomodulacyjnych, a konsekwencją tego procesu jest modyfikacja działania makrofagów. Ponadto poczynione obserwacje sugerują, że monitorowanie i**

regulacja procesu deiminacji jest kluczowa w procesie diagnostyki i leczenia schorzeń nie tylko ostrych, ale również przewlekłych.



Rycina 3. Cytrulinacja peptydu LL-37 wywołana uwolnieniem enzymu PAD2/4 z wnętrza obumarłych komórek prowadzi do inaktywacji jego funkcji neutralizujących prozapalne działanie agonistów receptorów TLR (LPS, LTA, Poli I:C). Efektem tego procesu jest silna indukcja ekspresji mediatorów stanu zapalnego przez makrofagi.

Należy podkreślić, że proces cytrulinacji białek i peptydów surowicy m.in. LL-37 może być też bezpośrednią konsekwencją infekcji bakteryjnej. Może do tego dochodzić w przypadku infekcji *P. gingivalis*, patogenu, który jako jedyny znany drobnoustrój posiada gen kodujący deminazę peptydyloargniniową (PPAD) [52]. Dotychczasowe badania wskazują, że ten bakteryjny enzym również katalizuje reakcję deiminacji LL-37, co prowadzi do zmiany fizjologicznych funkcji tego peptydu. Najnowsze dane dowodzą, że PPAD jest enzymem, którego rola może okazać się kluczowa w patogenezie paradontozy [53-55]. Ponadto, jako enzym zwiększający pulę cytrulinowanych epitopów gospodarza, może przyczyniać się do przełamania tolerancji immunologicznej, a tym samym rozwoju reumatoidalnego zapalenia stawów [56-59]. Dotychczasowa wiedza i najnowsze odkrycia dotyczące roli PPAD w rozwoju zapalenia przyzębia i konsekwencji tego procesu, jaką może być rozwój RZS, zostały opisane w pracy przeglądowej mojego współautorstwa [**Koziel *et al.* 2014**].

Modulacja funkcjonowania makrofagów, jako podstawowych, komórkowych elementów obrony nieswoistej nie ogranicza się do bezpośredniego działania czynników wirulencji patogenów, jak ma to miejsce w przypadku opisanej w poprzednim rozdziale karilizyny. Inaktywacja tych fagocytów może być egzekwowana również pośrednio, poprzez wpływ na aktywność enzymów gospodarza katalizujących modyfikacje potranslacyjne, co można sklasyfikować jako kolejną strategię wirulencji. Cytrulinacja jest

zaledwie jedną z możliwych modyfikacji, obok proteolizy, karbamylacji *etc*., a jak dowiodłam, ze względu na zasięg ogólnoustrojowy może wywierać ogromny wpływ na ostateczny przebieg infekcji. Badania te, wskazują na konieczność zwrócenia szczególnej uwagi na przebieg procesów biochemicznych zawiadujących modyfikacją cząstek o dużym potencjale immunomodulacyjnym.

2. Strategia bezpośrednia – modyfikacja komórki fagocyta

2.1. Zdefiniowanie cech i funkcji biologicznych makrofagów stanowiących niszę ekologiczną patogenów fakultatywnie wewnątrzkomórkowych

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.

Koziel J, Kmiecik K, Chmiest D, Maresz K, Mizgalska D, Maciag-Gudowska A, Mydel P, Potempa J. The role of Mcl-1 in *S. aureus*-induced cytoprotection of infected macrophages. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:427021.

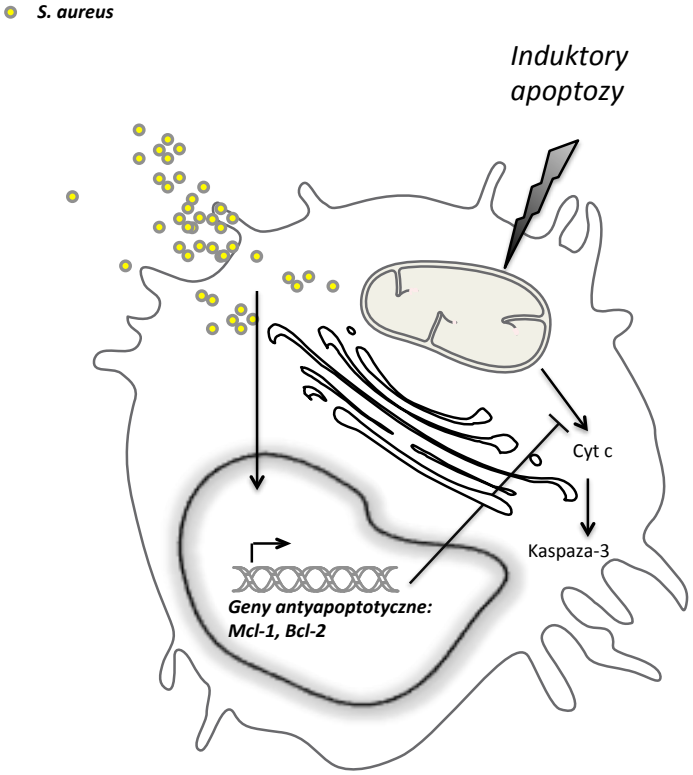
Koziel J*, Chmiest D, Bryzek D, Kmiecik K, Mizgalska D, Maciag-Gudowska A, Shaw LN, Potempa J. The Janus Face of α-Toxin: A Potent Mediator of Cytoprotection in Staphylococci-Infected Macrophages. J Innate Immun. 2015 ;7(2):187-98.

Gronkowiec złocisty (*Staphylococcus aureus)* zaliczany do Gram-dodatnich ziarniaków jest uważany za jeden z najgroźniejszych patogenów organizmu człowieka [60, 61]. Stanowi czynnik etiologiczny schorzeń o łagodnym przebiegu, mających często charakter lokalny (np. infekcje skórne, zatrucia pokarmowe), jednakże może być również przyczyną zagrażających życiu infekcji systemowych, takich jak artretyzm czy posocznica [60]. Wirulencja *S. aureus* determinowana jest przez szerokie spektrum czynników zjadliwości. Poza elementami strukturalnymi komórki (otoczki i adhezyny powierzchniowe), bardzo ważną rolę w patogenezie odgrywają białka sekrecyjne, a wśród nich szczególnie toksyny, które mogą działać lokalnie lub systemowo, indukując poważne stany chorobowe [62]. Na szczególną uwagę zasługują: enterotoksyna wywołująca zatrucia pokarmowe, toksyna epidermolityczna odpowiedzialna za pęcherzycę noworodków, płonicę gronkowcową, martwicę i złuszczanie naskórka (SSSS - ang. *staphylococcal scaled skin syndrome*), czy toksyna wstrząsu toksycznego powodująca zespół wstrząsu toksycznego (TSS - ang. *toxic shock syndrom*) [60-62]. Najnowsze badania dowiodły, że gronkowiec złocisty stosuje jeszcze jedną taktykę, która sprzyja kolonizacji i rozwojowi infekcji w organizmie ludzkim, a jest nią adaptacja do inwazji komórek nie pełniących funkcji immunologicznych i wewnątrzkomórkowego namnażania. Inwazja gronkowcowa do wnętrza nieprofesjonalnych komórek fagocytujących, w tym: keratynocytów, fibroblastów, komórek śródbłonkowych, nabłonkowych, enterocytów i osteoblastów [63-67] wiąże się z patogenezą takich chorób jak np. zapalenie wsierdzia (łac. *endocarditis*), gruczołu sutkowego u bydła (łac. *mastitis*), czy zapalenie szpiku kostnego (łac. *osteomyelitis*) [68]. Wyniki badań prowadzonych z moim udziałem potwierdziły powyższe obserwacje, dowiedliśmy bowiem wewnątrzkomórkowej lokalizacji *S. aureus* w tkance limfatycznej pobranej od dzieci poddanych adenotomii [69]. Zjawisko inwazji komórek gospodarza przez gronkowca złocistego obserwuje się również w przypadku profesjonalnych

komórek fagocytujących układu immunologicznego, w tym: neutrofili, monocytów i makrofagów. Wykazano, że podobnie jak wyspecjalizowane patogeny wewnątrzkomórkowe, takie jak: *Legionella pneumophila*, czy *Shigella*, tak i *S. aureus* neutralizuje mechanizmy bójcze ludzkich makrofagów, co pozwala bakterii na przeżycie i proliferację [70-72]. Dowiedziono, że w krótkim czasie po fagocytozie przez ludzkie makrofagi bakterie zostają ulokowane w „ciasnych" wakuolach otoczonych dwuwarstwową błoną lipidową. W ciągu kilku kolejnych dni po internalizacji bakterii, wakuole te powiększają swoje rozmiary i rozluźniają swoją strukturę prawdopodobnie wskutek aktywności zewnątrzwydzielniczej pochłoniętego gronkowca. W 4-5 dniu po infekcji obserwuje się częściową lub całkowitą degradację otaczającej wakuolę błony, a w kolejnych dniach gronkowiec uwalnia się do środowiska zewnętrznego. W ten sposób gronkowiec złocisty przeciwdziała mechanizmom bakteriobójczym makrofagów, paraliżując naturalną funkcję tych komórek [72].

Obserwacja wewnątrzkomórkowej lokalizacji *S. aureus* choć potwierdzona *in vitro* nie została dotychczas zanalizowana, a konsekwencje tego procesu dla rozwoju infekcji *in vivo* pozostały niewiadomą. Z tego względu zdecydowałam się rozpocząć badania zmierzające do identyfikacji molekularnych procesów determinujących przetrwanie gronkowca złocistego wewnątrz fagocyta i zmian fizjologicznych funkcji tych komórek wynikających z wewnątrzkomórkowej lokalizacji żywego patogenu. Prace te realizowałam w ramach projektów finansowanych przez Ministerstwo Nauki i Informatyzacji oraz Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, których byłam kierownikiem.

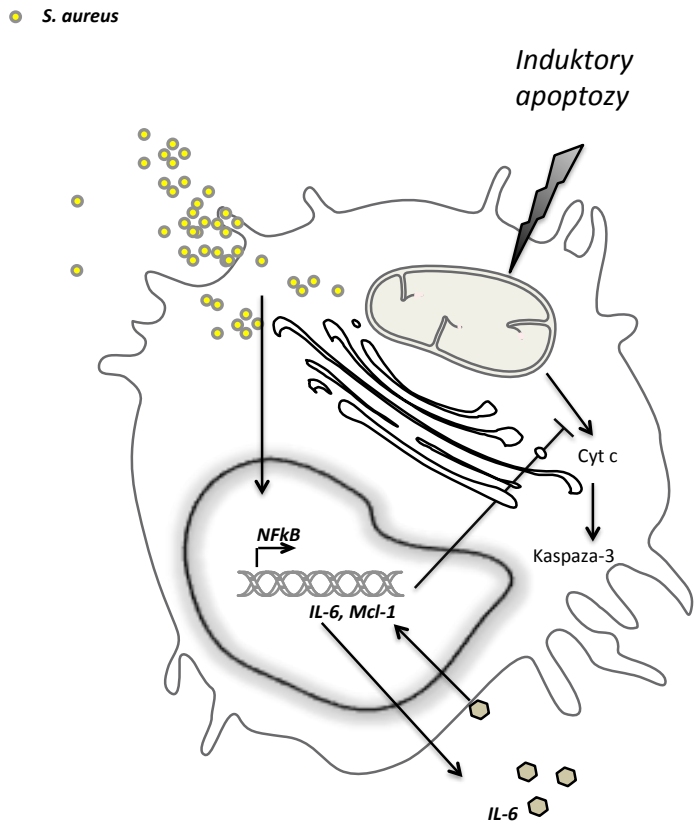
Pierwszym krokiem w moich badaniach była globalna ocena zmian transkryptomu zakażonej komórki wykonana techniką mikromacierzy. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały między innymi zmiany ekspresji genów kodujących receptory powierzchniowe, cząsteczki sygnałowe, mediatory stanu zapalnego, czynniki transkrypcyjne, białka adhezyjne, enzymy oraz białka zawiadujące procesami śmierci komórkowej. Idąc w ślad za znamienną indukcją w zakażonych komórkach ekspresji genów hamujących procesy śmierci komórkowej pierwsze badania ukierunkowałam na analizę zjawiska cytoprotekcji zakażonej komórki gospodarza. Taktyka blokowania mechanizmów prowadzących do samobójczej śmierci (apoptozy) zakażonej komórki jest typową strategią wielu wyspecjalizowanych patogenów wewnątrzkomórkowych, m.in. *Mycobacterium tuberculosis*. W moich badaniach udowodniłam, że istotnie, manifestacją fenotypową obserwowanych zmian transkryptomu jest cytoprotekcja, czyli zwiększona odporność zainfekowanych makrofagów na indukcję samobójczej śmierci komórkowej (apoptozy) [**Koziel *et al.*, 2009**]. Prowadzone prace z wykorzystaniem innych gatunków bakterii (*Escherichia coli, Bacillus subtilis*) wykazały, że proces cytoprotekcji zakażonych komórek jest specyficzny dla gronkowca złocistego i prowadzi do zahamowania mitochondrialnej ścieżki indukcji apoptozy. Na podstawie uzyskanych wyników zaproponowałam nowy mechanizm wirulencji gronkowca, który polega na wydłużeniu czasu życia makrofaga poprzez wzrost ekspresji genów anty-apoptotycznych w zakażonej komórce (Rycina 4). W omówionych powyżej badaniach zastosowałam ludzki model makrofagów różnicowanych *in vitro* z monocytów krwi obwodowej (hMdMs - ang. *human monocyte-derived macrophages*) oraz mysią linię komórkową makrofagów RAW264.7 [**Koziel *et al.*, 2009**]. Zjawisko cytoprotekcji zostało udowodnione w obydwu modelach badawczych, co może sugerować, że opisany mechanizm jest uniwersalnym dla ssaczych makrofagów.



Rycina 4. Fagocytoza gronkowca złocistego przez makrofagi indukuje proces cytoprotekcji poprzez indukcję ekspresji genów antyapoptotycznych (*Bcl-2*, *Mcl-1*), których produkty hamują uwalnianie cytochromu c z mitochondrium, a tym samym przeciwdziałają aktywacji kaspazy-3 i egzekucji procesu apoptozy.

W dalszych badaniach zidentyfikowałam ścieżkę przekazu sygnału prowadzącą do zwiększenia ekspresji genów determinujących odporność na śmierć komórkową przez apoptozę zainfekowanych gronkowcem złocistym makrofagów. Podwaliną tych badań była obserwacja zwiększonej, długoterminowej ekspresji genu *Mcl-1*, genu kluczowego dla przeżycia komórek linii mielopoetycznej. Przeprowadzone eksperymenty dowiodły, że wewnątrzkomórkowe działanie gronkowca złocistego jest dwutorowe, bo nie tylko zwiększa poziom ekspresji Mcl-1, ale również prowadzi do wydajnej stabilizacji tego białka. Wzrost ekspresji Mcl-1 generowany podczas infekcji *S. aureus* okazał się być istotnym elementem warunkującym cytoprotekcję, gdyż blokada jego ekspresji poprzez siRNA prowadziła do indukcji śmierci komórkowej na drodze apoptozy. W moich badaniach dowiodłam, że indukcja Mcl-1 w badanym modelu doświadczalnym jest zależna od ścieżki przekazu sygnału angażującej aktywację czynnika transkrypcyjnego NFκB oraz sekrecję IL-6 (Rycina 5) [**Koziel *et al.*, 2013**]. Ostatecznie, podjęłam próbę weryfikacji tezy zakładającej, że wzrost cytoprotekcji zainfekowanych makrofagów bez jednoczesnej eliminacji patogenu zlokalizowanego wewnątrzkomórkowo wiąże się ze zwiększeniem objawów stanu zapalnego w układzie *in vivo*. W tym celu wykorzystałam mysi model septycznego zapalenia stawów indukowany *S. aureus*. Gronkowiec złocisty stanowi czynnik etiologiczny w ponad 60% przypadkach infekcji nie rzeżączkowych, a chorobę charakteryzuje silny naciek makrofagów do przestrzeni okołostawowej oraz ich nadmierna i permanentna aktywacja, co koreluje ze zwiększonym stanem zapalnym. Wyniki przeprowadzonych badań dowiodły pozytywnej korelacji pomiędzy poziomem Mcl-1, obecnością żywych komórek gronkowca złocistego,

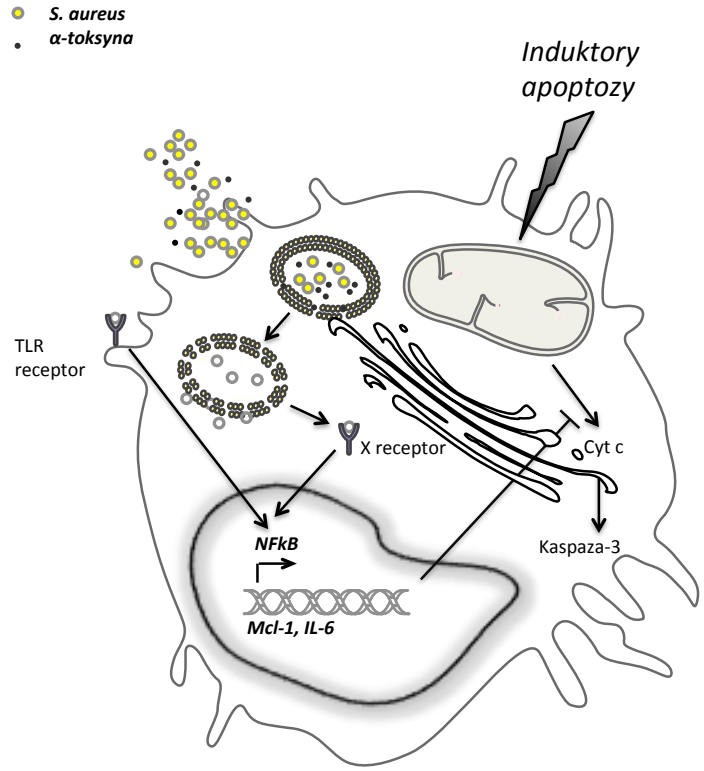
a stopniem lokalnej reakcji zapalnej [**Koziel *et al.*, 2013**]. **Z przeprowadzonych przeze mnie badań wynika jednoznacznie, że zlokalizowany wewnątrzkomórkowo gronkowiec złocisty podporządkowuje wybrane funkcje komórki własnym celom. Poprzez specyficzną indukcję genów antyapoptotycznych w zakażonej komórce utrzymuje przy życiu swoją nowo zdobytą niszę ekologiczną, jaką jest środowisko wewnątrzkomórkowe makrofagów** [**Koziel *et al*., 2013**].



Rycina 5. Cytoprotekcja makrofagów indukowana infekcją *S. aureus* jest procesem determinowanym ekspresją Mcl-1 dodatkowo wzmacnianą sekrecją IL-6.

Proces wewnątrzkomórkowego przeżywania gronkowca złocistego jest ściśle regulowany przez patogen i determinowany panelem czynników wirulencji ulegających ekspresji w danym szczepie bakteryjnym. Przykładowo, szczepy atenuowane pozbawione np. α-hemolizyny, aureolizyny, czy sortazy A mają mniejszą zdolność do przetrwania w surowych warunkach wnętrza makrofaga [72]. Dane te sugerują, że wewnątrzkomórkowe przeżywanie gronkowca złocistego jest jednym z mechanizmów wirulencji warunkowanymi obecnością konkretnych czynników patogenności. Podjęłam więc próbę identyfikacji molekularnego mechanizmu działania α-toksyny, która determinuje ochronę sfagocytowanej bakterii przed mechanizmami bakteriobójczymi komórek żernych [72]. Pierwszym krokiem była ocena ekspresji genu kodującego α-toksynę przez bakterie znajdujące się wewnątrz komórki makrofaga, która sugeruje sekrecję α-toksyny przez bakterie zlokalizowane wewnątrzkomórkowo [**Koziel *et al.*, 2015**]. Dalsze badania wykazały, że konsekwencją produkcji α-toksyny jest wzrost ekspresji genów chroniących zakażoną komórkę przed indukcją śmierci komórkowej. Znamiennie wyższa ekspresja genów antyapoptotycznych była

obserwowana podczas infekcji szczepami, które cechowała wysoka produkcja α-toksyny. Uzyskane wyniki dowiodły, że szlak przekazu sygnału prowadzący do cytoprotekcji nie jest indukowany bezpośrednio samą α-toksyną. Alfa toksyna działa pomocniczo, bierze bowiem udział w permeabilizacji fagosomów, a tym samym uwalnianiu bakterii z wakuoli do przestrzeni cytoplazmatycznej. Przedostanie się bakterii do cytoplazmy umożliwia prawdopodobnie oddziaływanie antygenów ściany komórkowej *S. aureus* z wewnątrzkomórkowymi receptorami dla molekularnych wzorców związanych z patogenami (PAMPs - ang. *pathogen associated molecular patterns*), typu TLR (ang. *Toll-like receptors*), czy NOD (ang. *Nod-like receptors*).
W konsekwencji dochodzi do aktywacji ścieżki przekazu sygnału z udziałem NFκB i sekrecji IL-6 (Rycina 6) [**Koziel *et al.*, 2015**]. Poprzez ekspresję α-toksyny, bakteria, która nie została wyeliminowana przez mechanizmy bakteriobójcze makrofaga, wzmaga ochronę swojej nowej niszy ekologicznej, w której pozostaje niewidoczna dla pozostałych komponent układu odpornościowego gospodarza (np. układ dopełniacza, przeciwciała) i czyni drobnoustrój bardziej wirulentnym. **Powyższe odkrycie obrazuje po raz pierwszy nową, niespodziewaną funkcję α-toksyny, która bierze udział w ograniczeniu procesu śmierci komórkowej.** Należy podkreślić, że dotychczas α-toksyna ta była uważana głównie za czynnik prowadzący do śmierci komórkowej poprzez lizę fosfolipidowej błony komórkowej [73]. Opisane powyżej odkrycie wskazuje na konieczność zweryfikowania roli tej toksyny jako czynnika wirulencji oraz na poszukiwanie dalszych, potencjalnych celów jej działania. Polem do poszukiwań czynników wirulencji zaangażowanych w adaptację wewnątrzkomórkowej niszy ekologicznej przez *S. aureus* są również proteazy sekrecyjne tego drobnoustroju. Rola tej klasy enzymów została jednoznacznie udowodniona w przypadku wielu patogenów wewnątrzkomórkowych [74].



Rycina 6. Alfa-toksyna gronkowca złocistego determinuje wewnątrzkomórkowe rozpoznanie drobnoustroju prowadząc do uwolnienia patogenu z wnętrza fagosomu. Tą drogą dochodzi do wzmocnienia ścieżki przekazu sygnału zawiadującego indukcją procesu cytoprotekcji w zainfekowanych makrofagach.

Ponieważ większość badań oceniających proces wewnątrzkomórkowego przeżywania *S. aureus* została wykonana na wyizolowanych układach *in vitro* [72, 75, 76], stąd zaistniała potrzeba weryfikacji tego procesu w warunkach *in vivo*. Fakt wyizolowania z miejsca toczącego się stanu zapalnego komórek (makrofagów, neutrofili) zawierających żywe gronkowce [77], zwiększa prawdopodobieństwo roli wewnątrzkomórkowego przeżywania *S. aureus* w rozwoju infekcji. Idąc w ślad za wynikami swoich badań obecnie prowadzę doświadczenia zmierzające do potwierdzenia tezy zakładającej, że komórka makrofaga stanowi nośnik dla bakterii i umożliwia jej rozprzestrzenianie po całym organizmie. W tym celu zoptymalizowałam mysi model indukcji infekcji gronkowcowej poprzez dootrzewnową iniekcję makrofagów zakażonych *ex vivo,* a wyniki uzyskanych badań wskazują, że *S. aureus* ulega rozsianiu do licznych tkanek i narządów wywołując objawy systemowej reakcji zapalnej. Tym samym, patogen ten naśladuje inne profesjonalnie wewnątrzkomórkowe drobnoustroje, które stosują podobną taktykę. Przykładowo: *Salmonella* Typhimurium*,* która wędruje w makrofagach z kępek Peyera do węzłów chłonnych, śledziony i wątroby [78, 79], czy *Listeria monocytogenes,* która po penetracji przez warstwę komórek nabłonka przewodu pokarmowego namnaża się w makrofagach, co przyczynia się do rozprzestrzenienia tych bakterii w różnych tkankach [80]. Lokalne zakażenia gronkowcowe często kończą się ogólnoustrojową infekcją, stąd dalsze zbadanie zjawiska systemowego rozsiewania gronkowca złocistego przy udziale komórek układu immunologicznego są bardzo istotne dla pełnego zrozumienia patogenezy infekcji gronkowcowych i z tego powodu są kontynuowane.

Podsumowując, obecnie uważa się, że podłoże wielu przewlekłych, nawracających i trudnych do leczenia infekcji gronkowcowych jest związane właśnie ze zdolnością *S. aureus*

do przeżywania wewnątrz komórek gospodarza, co chroni bakterię przed eliminacją zawiadywaną przez odpowiedź humoralną układu immunologicznego [68]. **Opisane powyżej odkrycie, jakim była identyfikacja modyfikacji funkcji makrofagów indukowanych wewnątrzkomórkową inwazją *S. aureus,* doprowadziła do scharakteryzowania nowej taktyki zjadliwości chorobotwórczych gronkowców.** Istotnym klinicznie wydaje się więc dokładne poznanie molekularnych mechanizmów regulujących ten proces. Znaczenia tej taktyce wirulencji dodaje fakt, że na całym świecie prowadzone są badania, które koncentrują się wokół wpływu leków i potencjalnych terapeutycznych związków na wewnątrzkomórkową proliferację *S. aureus* [81-83]. W kontekście nawracających, zagrażających życiu infekcji gronkowcowych oraz pojawiających się zmutowanych szczepów tej bakterii, poznanie mechanizmu wewnątrzkomórkowego przeżywania *S. aureus* w komórkach układu immunologicznego wydaje się być istotnym krokiem do stworzenia w pełni skutecznej terapii anty-gronkowcowej.

2.2. Modyfikacja ekspresji wybranych regulatorów stanu zapalnego w makrofagach pod wpływem patogenów i ich determinant wirulencji oraz wpływ tego procesu na fizjologię makrofagów

Blazusiak E, Florczyk D, Jura J, Potempa J, **Koziel J**. Differential regulation by Toll-like receptor agonists reveals that MCPIP1 is the potent regulator of innate immunity in bacterial and viral infections. *J Innate Immun*. 2013;5(1):15-23.

Strategie patogenności bakterii często bazują na zmianie fizjologicznej ekspresji genów w komórkach gospodarza. Przykładowo jak wspomniano w poprzednim rozdziale, moje badania wykazały, że wewnątrzkomórkowa kolonizacja makrofaga przez gronkowca złocistego prowadzi do globalnych zmian transkryptomu zakażonej komórki, czego konsekwencją jest adaptacja funkcjonalna tych komórek promująca przetrwanie patogenu [**Koziel *et al.*, 2009**]. Zmiany te dotyczą nie tylko opisanych powyżej genów regulujących proces śmierci komórkowej, ale także genów odpowiedzialnych za regulację stanu zapalnego. Jednym z nich jest gen *Zc3h12A*, którego produkt nazwano MCPIP-1 (ang. *monocyte chemotactic protein-induced protein-1*), lub Regnazą-1 [84]. Gen *Zc3h12A* został opisany w roku 2008 jako czynnik, którego ekspresja jest indukowana białkiem MCP-1, powszechnie znanym chemoatraktantem odpowiedzialnym za migrację monocytów i makrofagów oraz zaangażowanym w patogenezę chronicznych stanów zapalnych [85]. Prowadzone w intensywnym tempie badania doprowadziły do odkrycia, iż białko MCPIP-1 posiada domeny typu palca cynkowego (CCCH) oraz N-końcową domenę nukleazową PIN (ang. *PilT N terminus*) [86]. Domeny palca cynkowego zapewniają wiązanie MCPIP-1 do kwasów nukleinowych, zaś domena PIN odpowiada za aktywność MCPIP-1 jako RNazy, regulującej stabilność transkryptów dla niektórych cytokin (IL-1β, IL-6 oraz IL-12p40) [87]. MCPIP-1 posiada ponadto dwie domeny wiążące ubikwitynę (UBA oraz CUE), dla których proponuje się, że biorą udział w regulacji aktywności czynnika transkrypcyjnego NFκB [86, 87]. Wszystkie powyższe właściwości MCPIP-1 częściowo wyjaśniają silnie antyzapalne funkcje tego białka obserwowane po aktywacji receptora TLR-4 w doświadczeniach na mysim modelu z delecją genu *Zc3h12A* [87]. **Badania, które prowadziłam miały na celu identyfikację pozostałych ścieżek przekazu sygnału indukowanych rozpoznawaniem molekularnych wzorców patogenności prowadzących do zmian ekspresji białka MCPIP-1.** W swoich badaniach dowiodłam, że ekspresja MCPIP-1 jest

indukowana w odpowiedzi na aktywację wszystkich receptorów TLR w pierwotnych makrofagach ludzkich z wyjątkiem tych, których agonistą jest CpG [**Blazusiak *et al.*, 2013**]. Badania z wykorzystaniem oczyszczonych ligandów receptorów TLR zostały pozytywnie zweryfikowane w badaniach z zastosowaniem modeli infekcji bakteryjnej, grzybiczej i wirusowej. **Wyniki te dowiodły jednoznacznie, że białko MCPIP-1 stanowi globalny regulator nieswoistej reakcji odpornościowej, sterując zmianami odpowiedzi komórkowej podczas infekcji, co skutkuje m.in. zmianą poziomu transkryptów genów zaangażowanych w regulację stanu zapalnego**. Kolejnym etapem moich badań była ocena, czy obserwowane zmiany ekspresji tego białka indukowane podczas infekcji promują eliminację patogenu, czy jego przetrwanie. W tym celu wykorzystałam opisany powyżej model długoterminowej wewnątrzkomórkowej infekcji *S. aureus*. Na jego podstawie wykazałam, że choć gen *Zc3h12A* jest genem wczesnej odpowiedzi, to jego utrzymująca się stabilnie na wysokim poziomie ekspresja specyficznie towarzyszy długoterminowej kolonizacji wnętrza makrofaga przez *S. aureus* [**Koziel *et al*. 2009, Koziel *et al*. 2013**]. Ta obserwacja dowiodła, że indukcja MCPIP-1 stanowi indykator obecności patogenu i jego aktywności wewnątrzkomórkowej. Ponadto długotrwała ekspresja tego genu o silnym charakterze antyzapalnym prowadząc do zahamowania produkcji mediatorów prozapalnych może sprzyjać alternatywnej indukcji makrofagów i polaryzacji typu M2 promującej przetrwanie patogenów wewnątrzkomórkowych. Należy podkreślić, że taka modyfikacja fagocytów prowadząca do zahamowania stanu zapalnego jest typowa dla obligatoryjnie wewnątrzkomórkowych patogenów, które stosują tę taktykę celem ochrony swojej wewnątrzkomórkowej niszy ekologicznej [88]. **Dane te sugerują, że aktywacja ekspresji MCPIP-1 stanowiąca wrodzony mechanizm obronny leukocytów może zostać wykorzystana przez patogeny i stanowić jedną z taktyk osłabienia aktywności antybakteryjnej makrofagów podczas infekcji.** Zainicjowane badania nad rolą MCPIP-1 w infekcjach są obecnie kontynuowane w ramach mojego autorskiego projektu finansowanego ze źródeł Narodowego Centrum Nauki.

Najważniejsze wnioski płynące z prac, stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego:

1. *T. forsythia* stosuje taktykę wirulencji podobną do pozostałych periodontopatogenów bazującą na ekspresji metaloproteazy sekrecyjnej – karilizyny. Proteaza ta katalizuje proces ograniczonej proteolizy błonowej formy TNF-α z powierzchni makrofagów prowadząc do uwolnienia aktywnej biologicznie cytokiny, w sposób niezależny od konwertazy TACE. Sekrecja TNF-α promuje dalszą ekspresję cytokin prozapalnych prowadząc do wzmocnienia stanu zapalnego. Dodatkowo ekspresja karilizyny prowadzi do proteolitycznej inaktywacji peptydu antybakteryjnego LL-37, niwelując jego działanie bakteriobójcze i zdolność do neutralizacji endotoksyny bakteryjnej (LPS). Proces ten determinuje oporność *T. forsythia* na antybakteryjne działanie peptydu LL-37. Poczynione odkrycia wskazują na karilizynę jako potencjalny cel terapii w zapaleniu przyzębia.

2. Immunomodulacyjna aktywność peptydów antybakteryjnych względem makrofagów jest regulowana w procesie modyfikacji potranslacyjnych indukowanych infekcjami bakteryjnymi. Cytrulinacja peptydu LL-37 jest katalizowana w stanie zapalnym przy udziale ludzkich deiminaz peptydyloargininowych (PADs). Proces ten prowadzi do inaktywacji protekcyjnych właściwości peptydu względem agonistów receptorów Toll-like

(TLRs). Konsekwencją deiminacji LL-37, znoszącej zdolność peptydu do neutralizacji endotoksyny bakteryjnej, jest promowanie rozwoju stanu septycznego. Wzmożona cytrulinacja ma miejsce podczas procesu szoku septycznego, co wskazuje na potrzebę jednoznacznej identyfikacji stopnia deiminacji oraz stworzenia specyficznych i wydajnych inhibitorów.

3. Gronkowiec złocisty w aktywny i specyficzny sposób reguluje funkcjonowanie makrofagów poprzez modulację transkryptomu zakażonych komórek. Konsekwencją regulacji ekspresji genów jest zjawisko cytoprotekcji zakażonych komórek, co odgrywa rolę w rozwoju septycznego zapalenia stawów. Białko Mcl-1 jest jednym z determinantów cytoprotekcji zakażonych makrofagów, a indukcja jego ekspresji jest regulowana sekrecją IL-6. Alfa-toksyna gronkowca złocistego posiada nową, nieznaną dotąd funkcję jako czynnik promujący wewnątrzkomórkowe przeżywanie *S. aureus* i jednocześnie odpowiedzialny za wydajną blokadę samobójczej śmierci komórkowej zakażonych makrofagów. Udowodnienie powyższych procesów wskazuje jednoznacznie na konieczność rozszerzenia diagnostyki zakażeń gronkowcowych i poszukiwanie czynników terapeutycznych o wydajniejszej dystrybucji wewnątrzkomórkowej.

4. Białko MCPIP-1 stanowi centralny regulator odpowiedzi zapalnej w odpowiedzi na aktywację receptorów Toll-like w makrofagach. Jego aktywacja na poziomie mRNA i białka jest zróżnicowana, determinowana rodzajem drobnoustroju i czasem infekcji. Białko to może stanowić indykator obecności patogenów wewnątrzkomórkowych i promować ich przeżycie poprzez indukcję alternatywnego, antyzapalnego fenotypu makrofagów M2.

Referencje:

1. Lanternier F, Cypowyj S, Picard C, Bustamante J, Lortholary O, Casanova JL, Puel A. Primary immunodeficiencies underlying fungal infections. Curr Opin Pediatr. 2013 Dec;25(6):736-47.

2. Neth OW, Bajaj-Elliott M, Turner MW, Klein NJ. Susceptibility to infection in patients with neutropenia: the role of the innate immune system. Br J Haematol. 2005 Jun;129(6):713-22.

3. Doffinger R, Patel S, Kumararatne DS. Human immunodeficiencies that predispose to intracellular bacterial infections. Curr Opin Rheumatol. 2005 Jul;17(4):440-6.

4. Stiehm ER, Chin TW, Haas A, Peerless AG. Infectious complications of the primary immunodeficiencies. Clin Immunol Immunopathol. 1986 Jul;40(1):69-86.

5. Dropulic LK, Cohen JI. Severe viral infections and primary immunodeficiencies. Clin Infect Dis. 2011 Nov;53(9):897-909.

6. Boucher HW, Corey GR. Epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Clin Infect Dis. 2008 Jun 1;46 Suppl 5:S344-9.

7. Barin JG, Tobias LD, Peterson DA. The microbiome and autoimmune disease:Report from a Noel R. Rose Colloquium. Clin Immunol. 2015 Aug;159(2):183-8.

8. Kriegel MA. Self or non-self? The multifaceted role of the microbiota in immune-mediated

diseases. Clin Immunol. 2015 Aug;159(2):119-21.

9. Yurkovetskiy LA, Pickard JM, Chervonsky AV. Microbiota and autoimmunity:exploring new avenues. Cell Host Microbe. 2015 May 13;17(5):548-52.

10. Van Praet JT, Donovan E, Vanassche I, Drennan MB, Windels F, Dendooven A, Allais L, Cuvelier CA, van de Loo F, Norris PS, Kruglov AA, Nedospasov SA, Rabot S, Tito R, Raes J, Gaboriau-Routhiau V, Cerf-Bensussan N, Van de Wiele T, Eberl G, Ware CF, Elewaut D. Commensal microbiota influence systemic autoimmune responses. EMBO J. 2015 Feb 12;34(4):466-74.

11. Mikkelsen KH, Knop FK, Frost M, Hallas J, Pottegård A. Use of Antibiotics and Risk of Type 2 Diabetes: A Population-Based Case-Control Study. J Clin Endocrinol Metab. 2015 Aug 27:jc20152696.

12. Hashash JG, Chintamaneni P, Ramos Rivers CM, Koutroubakis IE, Regueiro MD, Baidoo L, Swoger JM, Barrie A, Schwartz M, Dunn MA, Binion DG. Patterns of Antibiotic Exposure and Clinical Disease Activity in Inflammatory Bowel Disease: A 4-year Prospective Study. Inflamm Bowel Dis. 2015 Aug 20.

13. Actis GC. The gut microbiome. Inflamm Allergy Drug Targets. 2014;13(4):217-23.

14. Proal AD, Albert PJ, Marshall TG. The human microbiome and autoimmunity. Curr Opin Rheumatol. 2013 Mar;25(2):234-40.

15. Ito T, Connett JM, Kunkel SL, Matsukawa A. The linkage of innate and adaptive immune response during granulomatous development. Front Immunol. 2013 Jan 31;4:10.

16. Liu PS, Lin YW, Burton FH, Wei LN. M1-M2 balancing act in white adipose tissue browning - a new role for RIP140. Adipocyte. 2015 Jan 7;4(2):146-8.

17. Zhang Y, Shi L, Mei H, Zhang J, Zhu Y, Han X, Zhu D. Inflamed macrophage microvesicles induce insulin resistance in human adipocytes. Nutr Metab (Lond).2015 Jun 6;12:21.

18. Yuan A, Hsiao YJ, Chen HY, Chen HW, Ho CC, Chen YY, Liu YC, Hong TH, Yu SL, Chen JJ, Yang PC. Opposite Effects of M1 and M2 Macrophage Subtypes on Lung Cancer Progression. Sci Rep. 2015 Sep 24;5:14273.

19. Potempa J, Pike RN. Corruption of innate immunity by bacterial proteases. J Innate Immun. 2009;1(2):70-87.

20. Wilensky A, Polak D, Houri-Haddad Y, Shapira L. The role of RgpA in the pathogenicity of Porphyromonas gingivalis in the murine periodontitis model. J Clin Periodontol. 2013 Oct;40(10):924-32.

21. Sbordone L, Bortolaia C. Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. Clinical oral investigations 2003;7:181-8.

22. Holt SC, Bramanti TE. Factors in virulence expression and their role in periodontal disease pathogenesis. Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists 1991;2:177-281.

23. Kinane DF, Preshaw PM, Loos BG. Host-response: understanding the cellular and molecular mechanisms of host-microbial interactions--consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. Journal of clinical periodontology 2011;38 Suppl 11:44-8.

24. Scott DA, Krauss J. Neutrophils in periodontal inflammation. Frontiers of oral biology 2012;15:56-83.

25. Figueredo CM, Fischer RG, Gustafsson A. Aberrant neutrophil reactions in periodontitis. Journal of periodontology 2005;76:951-5.

26. Havens AM, Chiu E, Taba M, Wang J, Shiozawa Y, Jung Y, et al. Stromal-derived factor-1alpha (CXCL12) levels increase in periodontal disease. Journal of periodontology 2008;79:845-53.

27. Dixon DR, Bainbridge BW, Darveau RP. Modulation of the innate immune response within the periodontium. Periodontology 2000 2004;35:53-74.

28. Matthews JB, Wright HJ, Roberts A, Cooper PR, Chapple IL. Hyperactivity and reactivity of peripheral blood neutrophils in chronic periodontitis. Clinical and experimental immunology 2007;147:255-64.

29. Matthews JB, Wright HJ, Roberts A, Ling-Mountford N, Cooper PR, Chapple IL. Neutrophil hyper-responsiveness in periodontitis. Journal of dental research 2007;86:718-22.

30. Sbordone L, Bortolaia C. Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. Clinical oral investigations 2003;7:181-8.

31. Tanner AC, Izard J. Tannerella forsythia, a periodontal pathogen entering the genomic era. Periodontol 2000. 2006; 42: 88–113.

32. Beutler B, Grau GE. Tumor necrosis factor in the pathogenesis of infectious diseases. Crit Care Med. 1993 Oct;21(10 Suppl):S423-35.

33. Azuma Y, Kaji K, Katogi R, Takeshita S, Kudo A. Tumor necrosis factor-a induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. J Biol Chem. 2000; 275: 4858–4864.

34. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-a from cells. Nature. 1997; 385: 729–733.

35. Karim AY, Kulczycka M, Kantyka T et al. A novel matrix metalloprotease-like enzyme (karilysin) of the periodontal pathogen Tannerella forsythia ATCC 43037. Biol Chem. 2010; 391: 105–117.

36. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. J Periodontol. 2003; 74: 391–401.

37. Potempa J. Posttranslational modifications in innate immunity. J Innate Immun. 2012;4(2):119-20.

38. Puklo M, Guentsch A, Hiemstra PS, Eick S, Potempa J. Analysis of neutrophil-derived antimicrobial peptides in gingival crevicular fluid suggests importance of cathelicidin LL-37 in the innate immune response against periodontogenic bacteria. Oral Microbiol Immunol. 2008 Aug;23(4):328-35.

39. Potempa J, Pike RN. Corruption of innate immunity by bacterial proteases. J Innate Immun. 2009;1(2):70-87.

40. Horsburgh S, Robson-Ansley P, Adams R, Smith C. Exercise and inflammation-related epigenetic modifications: focus on DNA methylation. Exerc Immunol Rev. 2015;21:26-41.

41. Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and inflammation. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011 May;31(5):986-1000.

42. Loos T, Mortier A, Gouwy M, Ronsse I, Put W, Lenaerts JP, VanDamme J, Proost P. Citrullination of CXCL10 and CXCL11 by peptidylarginine deiminase: a naturally occurring posttranslational modification of chemokines and new dimension of immunoregulation. Blood. 2008; 112: 2648–2656.

43. Proost P, Loos T, Mortier A, Schutyser E, Gouwy M, Noppen S, Dillen C, Ronsse I, Conings R, Struyf S, et al. Citrullination of CXCL8 by pep- tidylarginine deiminase alters receptor usage, prevents proteolysis, and dampens tissue inflammation. J. Exp. Med. 2008; 205: 2085–2097.

44. Zanetti M, Gennaro R, Romeo D. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a vari- able C-terminal antimicrobial domain. FEBS Lett. 1995; 374: 1–5.

45. Nizet V, Gallo RL. Cathelicidins and innate defense against invasive bacterial infection. Scand J Infect Dis 2003; 35: 670-676.

46. Vossenaar ER, Zendman AJ, van Venrooij WJ, Pruijn GJ. PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involve- ment in disease. Bioessays. 2003; 25: 1106–1118.

47. Vossenaar ER, Radstake TR, van der Heijden A, van Mansum MA, Dieteren C, de Rooij DJ, Barrera P, Zendman AJ, van Venrooij WJ. Expression and activity of citrullinating peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages. Ann. Rheum. Dis. 2004; 63: 373–381.

48. Nagaoka I, Hirota S, Niyonsaba F, Hirata M, Adachi Y, Tamura H, Heumann D. Cathelicidin family of antibacterial peptides CAP18 and CAP11 inhibit the expression of TNF-alpha by blocking the binding of LPS to CD14(+) cells. J. Immunol. 2001; 167: 3329–3338.

49. Cirioni O, Giacometti A, Ghiselli R, Bergnach C, Orlando F, Silvestri C, Mocchegiani F, Licci A, Skerlavaj B, Rocchi M, et al. LL-37 protects rats against lethal sepsis caused by Gram-negative bacteria. Antimicrob. Agents Chemother. 2006; 50: 1672–1679.

50. Scott MG, Davidson DJ, Gold M, Bowdish D, and Hancock R. The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. J. Immunol. 2002; 169: 3883–3891.

51. Mookherjee N, Brown K, Bowdish D, Doria S, Falsafi R, Hokamp K, Roche F, Mu R, Doho G, Pistolic J, et al. Modulation of the TLR- mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37. J Immunol. 2006; 176: 2455–2464.

52. McGraw WT, Potempa J, Farley D, Travis J. Purification, charac- terization, and sequence analysis of a potential virulence factor from Porphyromonas gingivalis, peptidylarginine deiminase. Infect Immun. 1999;67:3248–56.

53. Bielecka E, Scavenius C, Kantyka T, Jusko M, Mizgalska D, Szmigielski B, Potempa B, Enghild JJ, Prossnitz ER, Blom AM, Potempa J. Peptidyl arginine deiminase from Porphyromonas gingivalis abolishes anaphylatoxin C5a activity. J Biol Chem. 2014 Nov 21;289(47):32481-7.

54. Moelants EA, Loozen G, Mortier A, Martens E, Opdenakker G, Mizgalska D, Szmigielski B, Potempa J, Van Damme J, Teughels W, Proost P. Citrullination and proteolytic processing of chemokines by Porphyromonas gingivalis. Infect Immun. 2014 Jun;82(6):2511-9.

55. Gawron K, Bereta G, Nowakowska Z, Lazarz-Bartyzel K, Lazarz M, Szmigielski B, Mizgalska D, Buda A, Koziel J, Oruba Z, Chomyszyn-Gajewska M, Potempa J. Peptidylarginine deiminase from Porphyromonas gingivalis contributes to infection of gingival fibroblasts and induction of prostaglandin E2 -signaling pathway. Mol Oral Microbiol. 2014 Dec;29(6):321-32.

56. Maresz KJ, Hellvard A, Sroka A, Adamowicz K, Bielecka E, Koziel J, Gawron K, Mizgalska D, Marcinska KA, Benedyk M, Pyrc K, Quirke AM, Jonsson R, Alzabin S, Venables PJ, Nguyen KA, Mydel P, Potempa J. Porphyromonas gingivalis facilitates the development and progression of destructive arthritis through its unique bacterial peptidylarginine deiminase (PAD). PLoS Pathog. 2013 Sep;9(9):e1003627.

57. Quirke AM, Lugli EB, Wegner N, Hamilton BC, Charles P, Chowdhury M, Ytterberg
AJ, Zubarev RA, Potempa J, Culshaw S, Guo Y, Fisher BA, Thiele G, Mikuls TR, Venables PJ. Heightened immune response to autocitrullinated Porphyromonas gingivalis peptidylarginine deiminase: a potential mechanism for breaching immunologic tolerance in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 2014 Jan;73(1):263-9.

58. Laugisch O, Wong A, Sroka A, Kantyka T, Koziel J, Neuhaus K, Sculean A, Venables PJ, Potempa J, Möller B, Eick S. Citrullination in the periodontium-a possible link between periodontitis and rheumatoid arthritis. Clin Oral Investig. 2015 Aug 13.

59. Montgomery AB, Kopec J, Shrestha L, Thezenas ML, Burgess-Brown NA, Fischer R,
Yue WW, Venables PJ. Crystal structure of Porphyromonas gingivalis peptidylarginine deiminase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 2015 Jul 24. pii: annrheumdis-2015-207656.

60. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med. 1998; 339 (8), 520-532.

61. Archer GL. *Staphylococus aureus*: A well-armed pathogen. Clin Infect Dis. 1998; 26, 1179 -1181.

62. Murray RJ. Recognition and management of *Staphylococcus aureus* toxin-mediated disease. Intern Med J. 2005; 35(2), 106-119.

63. Bayles K, Wesson C, Liou L, Fox L, Bohach G, Trumble W. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. Infect Immun 1998; 66(1), 336-42.

64. Hess D, Henry-Stanley M, Erickson E, Wells C. Intracellular survival of *Staphylococcus aureus* within cultured enterocytes. J Surg Res. 2003; 114, 42-49.

65. Hudson M, Ramp W, Nicholson N, Williams A, Nousiainen M. Internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured osteoblasts. Microb Pathog 1995; 19(6), 409-419.

66. Menzies B, Kourteva I. Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces apoptosis. Infect Immun. 1998; 66, 5994-5998.

67. Nuzzo I, Sanges M, Folgore A, Carratelli C. Apoptosis of human keratinocytes after bacterial invasion. FEMS Immunol Med Microbiol. 2000; 27, 235-240.

68. Lowy F. Is *Staphylococcus aureus* an intracellular pathogen? Trends Microbiol. 2000; 8(8), 341-343.

69. Dobroś W, Pacura B, Fraczek W, Klisowski T, Potempa J, Kozieł J. [Identification of *Staphylococcus aureu*s in homogenates of hypertrophic adenoid (a preliminary report)]. Przegl Lek. 2010;67(5):355-6.

70. Sinai A, Joiner K. Safe haven: the cell biology of nonfusogenic pathogen vacuoles. Annu Rev Microbiol. 1997; 51, 415-462.

71. Goebel W, Kuhn M. Bacterial replication in the host cell cytosol. Curr Opin Microbiol. 2000; 3(1), 49-53.

72. 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.

73. Bhakdi S, Tranum-Jensen J: Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. Microbiol Rev. 1991; 55:733–751.

74. Dubin G, Koziel J, Pyrc K, Wladyka B, Potempa J. Bacterial proteases in disease - role in intracellular survival, evasion of coagulation/ fibrinolysis innate defenses, toxicoses and viral infections. Curr Pharm Des. 2013;19(6):1090-113.

75. Baughn R, Bonventre P. Phagocytosis and intracellular killing of *Staphylococcus aureus* by normal mouse peritoneal macrophages. Infect Immun. 1975; 12, 346-352.

76. Craven N, Anderson J. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by bovine mammary gland macrophages and intracellular protection from antibiotic action *in vitro* and *in vivo*. J Dairy Res. 1984; 51(4), 513-523.

77. Gresham H, Lowrance J, Caver T, Wilson B, Cheung A, Lindberg F. Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. J Immunol. 2000; 164, 3713-3722.

78. Monack D, Hersh D, Ghori N, Bouley D, Zychlinsky A, Falkow S. *Salmonella* exploits caspase-1 to colonize Peyer's patches in a murine typhoid model. J Exp Med. 2000; 192(2), 249-258.

79. Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Baumler A, Falkow S, Valdivia R, Brown W, Le M, Berggren R, Parks W, Fang F. Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. Nature. 1999; 401(6755), 804-808.

80. Drevets D. Dissemination of *Listeria monocytogenes* by infected phagocytes. Infect Immun. 1999; 67(7), 3512-3517.

81. Barcia-Macay M, Seral C, Tulkens P. Pharmacodynamic evaluation of the intracellular activities of antibiotics against *Staphylococcus aureus* in a model of THP-1 macrophages. Antimicrob Agent Chemother. 2006; 50(3), 841-851.

82. Onyeji C, Nightingale C, Marangos M. Enhanced killing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in human macrophages by liposome-entrapped vancomycin and teicoplanin. Infection. 1994; 22(5), 338-342.

83. Seral C, Van Bambeke F, Tulkens P. Quantitative analysis of gentamicin, azithromycin, telithromycin, ciprofloxacin, moxifloxacin, and oritavancin (LY333328) activities against intracellular *Staphylococcus aureus* in mouse J774 macrophages. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47(7), 2283-2292.

84. Liang J, Wang J, Azfer A, Song W, Tromp G, Kolattukudy PE, Fu M. A novel CCCH-zinc finger protein family regulates proinflammatory activation of macrophages. J Biol Chem. 2008 Mar 7;283(10):6337-46.

85. Gavrilin MA, Deucher MF, Boeckman F, Kolattukudy PE. Monocyte chemotactic protein 1 upregulates IL-1beta expression in human monocytes. Biochem Biophys Res Commun. 2000 Oct 14;277(1):37-42.

86. Zhou L, Azfer A, Niu J, Graham S, Choudhury M, Adamski FM, Younce C, Binkley PF, Kolattukudy PE. Monocyte chemoattractant protein-1 induces a novel transcription factor that causes cardiac myocyte apoptosis and ventricular dysfunction. Circ Res. 2006 May 12;98(9):1177-85.

87. Matsushita K, Takeuchi O, Standley DM, Kumagai Y, Kawagoe T, Miyake T, Satoh T, Kato H, Tsujimura T, Nakamura H, Akira S. Zc3h12a is an RNase essential for controlling immune responses by regulating mRNA decay. Nature. 2009 Apr 30;458(7242):1185-90.

88. Muraille E, Leo O, Moser M. TH1/TH2 paradigm extended: macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism? Front Immunol. 2014 Nov 26;5:603.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych:

Główny nurt prowadzonych przeze mnie badań dotyczy regulacji funkcjonowania mechanizmów odpowiedzi wrodzonej na infekcje. Ze względu na to biorę aktywny udział w prowadzeniu prac badawczych realizowanych nie tylko na WBBiB, UJ, ale też poza macierzystą jednostką naukową. W niniejszej części omówiłam wybrane aspekty mojej pracy badawczej, bazującej w dużej mierze na wspomnianej współpracy. Pragnę nadmienić, że opisane poniżej tematy badawcze były realizowane już po uzyskaniu przez mnie tytułu doktora.

Temat badawczy:
Identyfikacja czynników wirulencji periodontopatogenów i ich wpływ na rozwój innych schorzeń, w tym chorób autoimmunologicznych.

Zapalenie przyzębia jest skutkiem bakteryjnej infekcji wielogatunkowej. Z tego względu, ocena mechanizmów zawiadujących inicjacją oraz progresją choroby nie została do dziś dnia precyzyjnie określona. Potwierdzeniem tego faktu jest strategia wirulencji drobnoustroju *T. forsythia*, który pojawia się wraz z innymi patogenami w najbardziej zaawansowanym stadium choroby, a którego mechanizmy patogenności pozostawały przez wiele lat nieznane. Dopiero ostatnie odkrycia, w których brałam aktywny udział zidentyfikowały determinanty wirulencji tego patogenu [1]. Wyniki te, w kontekście wzrastającej prewalencji paradontozy wśród społeczeństwa wskazują na konieczność prowadzenia badań w tym zakresie. Zainteresowania grup badawczych Zakładu Mikrobiologii, WBBiB, UJ koncentrują się na powyższej tematyce, a ja biorę w tych pracach aktywny udział jako wykonawca projektów nawiązujących do tego problemu badawczego. Moja rola polega na weryfikacji roli określonych komponent bakteryjnych na proces wirulencji drobnoustroju. Owocem tych badań jest przykładowo identyfikacja deiminazy peptydyloargininowej *P. gingivalis* (PPAD) jako czynnika promującego rozwój stanu zapalnego. Wykazane zostało, że ekspresja PPAD promuje inwazję bakterii do fibroblastów dziąsłowych, aktywując w ten sposób szlak ekspresji prostaglandyn [2]. Ponadto modyfikacja epidermalnego czynnika wzrostu (EFG) przez ten enzym wpływa na inaktywację jego funkcji, co hamuje regenerację tkanki uszkodzonej efektem toczącego się lokalnego stanu zapalnego [3].

W kręgu moich zainteresowań jest również identyfikacja mechanizmu molekularnego łączącego zapalenie przyzębia z rozwojem chorób systemowych, przykładowo RZS. Badania prowadzone w tym temacie udowodniły rolę PPAD jako czynnika wirulencji *P. gingivalis* wpływającego na zwiększenie podatności na rozwój zapalenia stawów [4]. Ponadto prace, które obecnie prowadzę, wskazują jednoznacznie, że czynniki wirulencji *P. gingivalis* sprzyjają indukcji tworzenia zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilowych (NETs = ang. *neutrophil extracellular traps*), a tym samym znacznej ekspozycji antygenów gospodarza, co sprzyja przełamaniu tolerancji immunologicznej.

Wybrane publikacje związane z tym zagadnieniem badawczym:

1. Ksiazek M, Karim AY, Bryzek D, Enghild JJ, Thøgersen IB, **Koziel J**, Potempa J. Mirolase,

a novel subtilisin-like serine protease from the periodontopathogen *Tannerella forsythia*. Biol Chem. 2014 Nov 13.
2. Gawron K, Bereta G, Nowakowska Z, Lazarz-Bartyzel K, Lazarz M, Szmigielski B, Mizgalska D, Buda A, **Koziel J**, Oruba Z, Chomyszyn-Gajewska M, Potempa J. Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* contributes to infection of gingival fibroblasts and induction of prostaglandin E(2) -signaling pathway. Mol Oral Microbiol. 2014 Dec;29(6):321-332.
3. Pyrc K, Milewska A, Kantyka T, Sroka A, Maresz K, **Kozieł J**, Nguyen KA, Enghild JJ, Knudsen AD, Potempa J. Inactivation of epidermal growth factor by *Porphyromonas gingivalis* as a potential mechanism for periodontal tissue damage. Infect Immun. 2013 Jan;81(1):55-64.
4. Maresz KJ, Hellvard A, Sroka A, Adamowicz K, Bielecka E, **Koziel J**, Gawron K, Mizgalska D, Marcinska KA, Benedyk M, Pyrc K, Quirke AM, Jonsson R, Alzabin S, Venables PJ, Nguyen KA, Mydel P, Potempa J. *Porphyromonas gingivalis* facilitates the development and progression of destructive arthritis through its unique bacterial peptidylarginine deiminase (PAD). PLoS Pathog. 2013 Sep;9(9):e1003627.

Temat badawczy:
Ocena mechanizmów patogenności gronkowca złocistego i poszukiwanie nowych związków terapeutycznych.

Gronkowiec złocisty jest patogenem wykorzystującym bardzo wiele różnych strategii wirulencji, które pomimo wielu lat pracy naukowców na całym świecie nadal pozostają nie w pełni poznane. O konieczności prowadzenia badań w tym kierunku najlepiej świadczy prewalencja infekcji gronkowcowych.

W swojej pracy habilitacyjnej koncentrowałam się na szczególnym mechanizmie wirulencji *S. aureus*, jakim jest zasiedlanie wnętrza makrofagów. Poza pracami, które stanowią podstawę mojego postępowania habilitacyjnego brałam czynny udział w powstawaniu innych publikacji nawiązujących do tej tematyki. Kluczowym osiągnięciem badań prowadzonych w tym temacie była identyfikacja długoterminowego przeżywania gronkowca złocistego w ludzkich makrofagach [1]. Publikacja ta opublikowana w roku 2008 do chwili obecnej jest już cytowana ponad 120 razy. Unikatowy na skalę światową warsztat badawczy stworzony podczas realizacji tej publikacji zachęcił inne jednostki naukowe do nawiązania z nami współpracy w tym zakresie. W ramach tych prac wraz z naukowcami z Uniwersytetu na Florydzie (UoF) dokonaliśmy odkrycia roli dwuskładnikowego systemu regulacyjnego NsaRS w wirulencji *S. aureus* [2].

Ponieważ strategia wewnątrzkomórkowego przeżywania *S. aureus* jest często postulowana w przypadku przewlekłych i nawracających infekcji górnych dróg oddechowych, stąd prowadziłam badania mające na celu poznanie etiologii przerostów w noso-gardzieli. Naszym odkryciem była identyfikacja zlokalizowanego wewnątrzkomórkowo *S. aureus* w próbkach pacjentów poddanych adenotomii [3].

Drugi nurt prowadzonych badań dotyczących mechanizmów wirulencji *S. aureus*, w których biorę udział, koncentruje się na roli proteaz sekrecyjnych. W ramach współpracy z prof. Lindsay Shaw (UoF) dokonaliśmy odkrycia udziału leucynowej aminopeptydazy (LAP) w infekcji lokalnej i systemowej *S. aureus*. Randze temu odkryciu nadaje fakt, że badania wykonano z zastosowaniem nie tylko klasycznych szczepów bakteryjnych, ale też szczepów

klinicznych powodujących ciężkie infekcje płuc (USA300). W omawianej pracy stosując szczepy zmutowane dowiedliśmy, że ekspresja tej proteazy warunkuje wewnątrzkomórkowe przetrwanie patogenu. Co więcej, wykazaliśmy, że ekspresja genu kodującego LAP (*pepZ*) gwałtownie wzrasta u bakterii zlokalizowanych wewnątrzkomórkowo [4]. Dane te potwierdzają rolę proteaz w wewnątrzkomórkowym przeżywaniu patogenów.

W związku z moimi zainteresowaniami naukowymi zostałam zaproszona do przygotowania rozdziału do publikacji przeglądowej, w której opisałam najnowsze dane potwierdzające rolę proteaz bakteryjnych w adaptacji wewnątrzkomórkowej niszy ekologicznej [5].

Ponieważ badania prowadzone przeze mnie dotyczą interakcji patogen-gospodarz, stąd brałam udział w pracach zmierzających do identyfikacji czynników gospodarza, które odgrywają znaczącą rolę w obronie przed infekcją *S. aureus*. Owocem tych prac była odkryta aktywność ludzkich inhibitorów – serpin, która prowadzi do skutecznej inaktywacji potencjalnie szkodliwego działania proteaz gronkowca złocistego [6]. Poza pracami oryginalnymi owocem tych zainteresowań było przygotowanie pracy przeglądowej, której podsumowałam stan wiedzy dotyczący roli proteaz bakteryjnych w skórze [7].

Kolejnym nurtem prac badawczych prowadzonych w tematyce infekcji gronkowcem złocistym są badania, których celem jest znalezienie skutecznych związków terapeutycznych. Dotychczas brałam udział w ocenie antybakteryjnego efektu działania nanocząsteczek platyny, które jednakże nie wykazywały bakteriobójczego działania względem gronkowca złocistego [8]. Ponadto, w ubiegłym roku rozpoczęłam współpracę z prof. dr hab. Adamem Lesnerem z Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, z którym obecnie prowadzimy badania mające na celu ocenę wpływu koniugatów peptydów o właściwościach antybakteryjnych na wewnątrzkomórkową eradykację *S. aureus*.

Wybrane publikacje związane z tym zagadnieniem badawczym:

1. 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.
2. Kolar SL, Nagarajan V, Oszmiana A, Rivera FE, Miller HK, Davenport JE, Riordan JT, Potempa J, Barber DS, **Koziel J**, Elasri MO, Shaw LN. NsaRS is a cell-envelope-stress-sensing two-component system of *Staphylococcus aureus*. Microbiology. 2011 Aug;157(Pt 8):2206-19.
3. Dobroś W, Pacura B, Fraczek W, Klisowski T, Potempa J, **Kozieł J**. [Identification of *Staphylococcus aureu*s in homogenates of hypertrophic adenoid (a preliminary report)]. Przegl Lek. 2010;67(5):355-6.
4. Carroll RK, Robison TM, Rivera FE, Davenport JE, Jonsson IM, Florczyk D, Tarkowski A, Potempa J, **Koziel J**, Shaw LN. Identification of an intracellular M17 family leucine aminopeptidase that is required for virulence in *Staphylococcus aureus*. Microbes Infect. 2012 Sep;14(11):989-99.
5. Dubin G, **Koziel J**, Pyrc K, Wladyka B, Potempa J. Bacterial proteases in disease - role in intracellular survival, evasion of coagulation/ fibrinolysis innate defenses, toxicoses and viral infections. Curr Pharm Des. 2013;19(6):1090-113. Review.
6. Kantyka T, Plaza K, **Koziel J**, Florczyk D, Stennicke HR, Thogersen IB, Enghild JJ, Silverman GA, Pak SC, Potempa J. Inhibition of *Staphylococcus aureus* cysteine

proteases by human serpin potentially limits staphylococcal virulence. Biol Chem.2011 May;392(5):483-9.
7. **Koziel J**, Potempa J. Protease-armed bacteria in the skin. Cell Tissue Res. 2013 Feb;351(2):325-37.
8. Konieczny P, Goralczyk AG, Szmyd R, Skalniak L, **Koziel J**, Filon FL, Crosera M,Cierniak A, Zuba-Surma EK, Borowczyk J, Laczna E, Drukala J, Pyza E, Semik D,Woznicka O, Klein A, Jura J. Effects triggered by platinum nanoparticles on primary keratinocytes. Int J Nanomedicine. 2013;8:3963-75.

Temat badawczy:
Molekularne podstawy uszkodzenia błony śluzowej przewodu pokarmowego i etiologia następstw tych procesów z uwzględnieniem potencjalnych związków terapeutycznych.

Tematyka mojej rozprawy doktorskiej koncentrowała się na infekcji *H. pylori* i następstwach tego procesu jakim jest m.in. indukcja owrzodzeń nabłonka wyścielającego światło żołądka, czy chłoniaka typu MALT. Badania rozpoczęte podczas studiów doktoranckich kontynuowałam w późniejszym czasie w ramach współpracy z prof. dr hab. Piotrem Konturkiem z Uniwersytetu w Jenie (Turyngia). W ramach tych prac naukowych dokonano szeregu odkryć, m.in. protekcyjnego wpływu probiotycznego szczepu *E. coli Nissle* na ostre uszkodzenia śluzówki żołądka [1]. Podobnie wykazaliśmy pozytywny efekt dystrybucji pioglitazonu – agonisty PPAR gamma na leczenie chronicznych wrzodów żołądka i ochronnym wpływie na ostre uszkodzenia śluzówki żołądka [2, 3]. Badania, w których brałam udział dotyczyły również uszkodzeń przełyku będących między innymi skutkiem refluksu treści żołądkowej. W ramach prac nad tą jednostką kliniczną zostało dowiedzione, że melatonina produkowana w przewodzie pokarmowym odgrywa istotną rolę protekcyjną na błonę śluzową przewodu pokarmowego. Wykazaliśmy ochronne działanie melatoniny na eksperymentalne uszkodzenia śluzówki w przełyku i żołądku. Ostatecznie dowiedliśmy, że działanie protekcyjne melatoniny bazuje na efekcie antyoksydacyjnym oraz na blokowaniu generacji cytokin prozapalnych [4]. Częstą konsekwencją stanu zapalnego błony śluzowej przełyku jest rozwój zmian wtórnych o charakterze metaplazji jelitowej, co określone zostało klinicznie jako tzw. Przełyk Barretta. Badania, w których uczestniczyłam koncentrowały się na etiologii zmian nowotworowych [5, 6], jak również dotyczyły badań nad potencjalnym związkiem terapeutycznym jakim jest kwas acetylosalicylowy uwalniający tlenek azotu zwany nitroaspiryną, stanowiący pochodną aspiryny zawierająca grupę azotanową w postaci estru. Ta pochodna aspiryny ulega rozkładowi w organizmie uwalniając tlenek azotu. Nasze badania wykazały, że związek ten hamuje wzrost zróżnicowanych nowotworowo komórek nabłonka przełyku [7, 8]. W naszych badaniach oceniliśmy również wpływ innej pochodnej aspiryny – uwalniającej witaminę C, porównując efekt terapii uszkodzeń błony śluzowej wywołanej infekcją *H. pylori* do klasycznej aspiryny. Badania te wykazały redukcję liczby uszkodzeń u pacjentów traktowanych zmodyfikowaną aspiryną, czego molekularnym wyjaśnieniem jest zmiana regulacji syntezy tlenku azotu [9].

Wybrane publikacje związane z tym zagadnieniem badawczym:

1. Konturek PC, Sliwowski Z, **Koziel J**, Ptak-Belowska A, Burnat G, Brzozowski T, Konturek SJ. Probiotic bacteria *Escherichia coli* strain Nissle 1917 attenuates acute gastric lesions induced by stress. J Physiol Pharmacol. 2009 Dec;60 Suppl 6:41-8.
2. Konturek PC, Brzozowski T, Burnat G, Szlachcic A, **Koziel J**, Kwiecien S, Konturek SJ, Harsch IA. Gastric ulcer healing and stress-lesion preventive properties of pioglitazone are attenuated in diabetic rats. J Physiol Pharmacol. 2010 Aug;61(4):429-36.
3. Konturek PC, **Kania J**, Kukharsky V, Raithel M, Ocker M, Rembiasz K, Hahn EG, Konturek SJ. Implication of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and proinflammatory cytokines in gastric carcinogenesis: link to *Helicobacter pylori*-infection. J Pharmacol Sci. 2004 Oct;96(2):134-43.
4. Konturek PC, Brzozowska I, Targosz A, Pawlik M, **Kania J**, Hess T, Kwiecien S, Konturek SJ, Reiter RJ, Brzozowski T. Esophagoprotection mediated by exogenous and endogenous melatonin in an experimental model of reflux esophagitis. J Pineal Res. 2013 Aug;55(1):46-57.
5. Konturek PC, Nikiforuk A, **Kania J**, Raithel M, Hahn EG, Mühldorfer S. Activation of NFkappaB represents the central event in the neoplastic progression associated with Barrett's esophagus: a possible link to the inflammation and overexpression of COX-2, PPARgamma and growth factors. Dig Dis Sci. 2004 Aug;49(7-8):1075-83.
6. Konturek PC, **Kania J**, Burnat G, Hahn EG, Konturek SJ. Prostaglandins as mediators of COX-2 derived carcinogenesis in gastrointestinal tract. J Physiol Pharmacol. 2005 Sep;56 Suppl 5:57-73. Review.
7. Konturek PC, **Kania J**, Burnat G, Hahn EG. NO-releasing aspirin exerts stronger growth inhibitory effect on Barrett's adenocarcinoma cells than traditional aspirin. J Physiol Pharmacol. 2006 Dec;57 Suppl 12:15-24.
8. Konturek PC, **Kania J**, Hahn EG, Konturek JW. Ascorbic acid attenuates aspirin-induced gastric damage: role of inducible nitric oxide synthase. J Physiol Pharmacol. 2006 Nov;57 Suppl 5:125-36.
9. Konturek PC, **Kania J**, Gessner U, Konturek SJ, Hahn EG, Konturek JW. Effect of vitamin C-releasing acetylsalicylic acid on gastric mucosal damage before and after *Helicobacter pylori* eradication therapy. Eur J Pharmacol. 2004 Dec 15;506(2):169-77.

Temat badawczy:
Mechanizmy regulacji stanu zapalnego.

Zagadnienie regulacji stanu zapalnego towarzyszyło mi od początku mojej pracy naukowej, którą rozpoczęłam jako doktorantka w Zakładzie Biochemii Komórki kierowanym przez prof. dr hab. Aleksandra Koja. Te zainteresowania badawcze kontynuowałam podczas dalszej pracy naukowej. Przykładowo jako wykonawca projektu zatytułowanego "Mediterranean Local Food Plants: Potential New Nutraceuticals and Current Role in the Diet." (5th European Frame Project) badałam w modelach *in vitro* antyzapalną rolę ekstraktów roślinnych [1].

Innym tematem badań, w których brałam udział była ocena etiologii chronicznego stanu zapalnego obserwowanego w przypadku pacjentów cierpiących na boczne cysty szyjne. Badania prowadzone w tym temacie pomimo, że nie zdefiniowały czynnika septycznego, który byłby odpowiedzialny za powiększanie cyst, wskazały na zaburzone

procesy eliminacji obumarłych leukocytów w cystach. Skutkiem tego jest zaburzenie kontroli produkcji mediatorów zapalnych [2]. Badania zmierzające do wyjaśnienia zaburzeń regulacji stanu zapalnego w obrębie cyst bocznych szyjnych są nadal kontynuowane, a wyniki najnowszych badań podsumowane zostały w manuskrypcie przygotowywanym do publikacji.

Regulacja stanu zapalnego jest procesem, w którym w ostatnich latach dowiedziono znaczącego udziału nowo odkrytego białka MCPIP-1. Rola tego białka w regulacji mechanizmów obrony nieswoistej nie została jednakże dotychczas poznana i stanowi temat badawczy prowadzony pod moim kierownictwem, a finansowany przez Narodowe Centrum Nauki. W ramach tego zagadnienia realizujemy badania mające na celu ocenę roli MCPIP-1 w regulacji ekspresji IL-8 w komórkach nabłonkowych. Oceniamy również rolę MCPIP-1 w fibroblastach na proces gojenia uszkodzeń. Wyniki tego projektu były wielokrotnie prezentowane na forum krajowym i międzynarodowym. Obecnie trwają prace, których efekt będzie stanowił uzupełnienie do przygotowywanych do publikacji prac doświadczalnych w tym intrygującym temacie badawczym.

Wybrane publikacje związane z tym zagadnieniem badawczym:

1. Strzelecka M, Bzowska M, **Kozieł J**, Szuba B, Dubiel O, Riviera Núñez D, Heinrich M, Bereta J. Anti-inflammatory effects of extracts from some traditional Mediterranean diet plants. J Physiol Pharmacol. 2005 Mar;56 Suppl 1:139-56.
2. Dobros W, Burda K, Guzik K, **Koziel J***, Potempa J. Apoptotic cell clearance in chronic inflammation of lateral neck cysts. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2012 Mar;269(3):965-70.

Kozieł