SProf. dr hab. Piotr Trzonkowski
Kierownik Katedry i Zakładu Immunologii Medycznej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Gdańsk, 10.07.2022

Ocena osiągnięcia naukowego „Udział makrofagów oraz antygenowo-swoistych przeciwciał i ich łańcuchów lekkich w tolerancji i autotolerancji immunologicznej mediowanej przez egzosomalny miR-150 u myszy”
oraz innych osiągnięć naukowych, organizacyjnych i dydaktycznych
dr n. med. Katarzyny Nazimek
w związku z jej wnioskiem o nadanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne

I. Ocena Merytoryczna pracy

a. Tematyka badawcza i jej oryginalność

Osiągnięcie naukowe zaprezentowane we wniosku to cykl opublikowanych 5 prac, z których 4 to prace doświadczalne, a jedna to praca przeglądowa omawiająca współczesne rozumienie funkcji egzosomów w immunologii i tolerancji immunologicznej. Łączny IF osiągnięcia to prawie 27. Zgodnie z potwierdzoną deklaracją Habilitantka wykonała dużą część pracy doświadczalnej, analizę wyników, jest też autorem tekstów manuskryptów. We wszystkich pracach Habilitantka jest pierwszym autorem. Zaprezentowany cykl prac stanowi obserwacje o wspólnym mianowniku, a uzyskane wyniki są oryginalne.

b. Uzyskane rezultaty i ich znaczenie dla nauki i praktyki

Zasadniczą tematyką prezentowanego cyklu prac jest opis mechanizmu oddziaływania egzosomalnego miR-150 (ang. microRNA-150) na makrofagi prezentujące antygen. Efektem działania tych cząstek na makrofagi jest zahamowanie aktywności limfocytów T efektorowych. Dodatkowo Autorka opisuje rolę przeciwciał opłaszczających takie egzosomy. Zjawisko wydzielania egzosomów zawierających miR-150 przez subpopulację limfocytów T CD8+ supresyjnych zostało wcześniej opisane przez grupę, z której wywodzi się Habilitantka, a Jej doktorat w dużej mierze przyczynił się do tego odkrycia. Niewyjaśnionym pozostawał jednak

dokładny mechanizm działania egzosomalnego miR-150 w indukcji tolerancji immunologicznej.

W pierwszej pracy Autorka spróbowała udowodnić pochodzenie łańcuchów lekkich przeciwciał opłaszczających egzosomy wydzielane przez limfocyty T supresyjne i ich rolę w swoistości działania tolerogennego egzosomalnego miR-150. Wykazała, że u myszy szczepów μMT (charakteryzujących się niedoborem limfocytów B), Jα18 (charakteryzujących się niedoborem komórek iNKT, uczestniczących w aktywacji limfocytów B1) oraz JH-/- (z niedoborem immunoglobulin) nie dochodzi do wytworzenia tolerancji oraz że inkubacja izolowanych od tych myszy egzosomów transportujących miR-150 z haptenowo-swoistymi łańcuchami lekkimi przeciwciał monoklonalnych przywracała ich aktywność biologiczną i pozwala na indukcję tolerancji. W następnych doświadczeniach udowodniono, że swoistość działania egzosomów jest zależna od swoistości łańcuchów lekkich opłaszczających pęcherzyki. Dla potwierdzenia słuszności tego wniosku, egzosomy uzyskane od myszy szczepu JH-/- toleryzowanych na hapten oksazolonowy opłaszczono in vitro TNP-swoistymi łańcuchami lekkimi swoistymi przed ich inkubacją z TNP-swoistymi komórkami efektorowymi CHS, natomiast egzosomy od myszy JH-/- toleryzowanych na TNP opłaszczono in vitro oksazolonowo-swoistymi łańcuchami lekkimi swoistymi przed ich inkubacją z oksazolonowo-swoistymi komórkami efektorowymi. W obu przypadkach zaobserwowano supresję transferowanej adoptywnie reakcji kontaktowej u biorców komórek efektorowych. Natomiast nie stwierdzono zahamowania reakcji CHS na oksazolon u biorców komórek efektorowych inkubowanych z egzosomami opłaszczonymi TNP-swoistymi łańcuchami lekkimi, jak również reakcji CHS na TNP u biorców komórek efektorowych inkubowanych z egzosomami opłaszczonymi albo łańcuchami lekkimi swoistymi względem oksazolonu, albo TNP-swoistymi łańcuchami ciężkimi przeciwciał. Dodatkowym dowodem były doświadczenia z owoalbuminą w modelu mysim, gdzie zaobserwowano przywrócenie aktywności supresyjnej egzosomów otrzymanych od toleryzowanych myszy JH-/-, poprzez ich inkubację z łańcuchami lekkimi przeciwciał swoistych względem białka jaja kurzego. Kolejne doświadczenia dotyczyły prób zahamowania reakcji autoimmunologicznych przez aktywację limfocytów T supresyjnych wydzielających egzosomalny miR-150. Habilitantka opracowała model reakcji DTH indukowanej u myszy podaniem śródskórnym syngenicznych erytrocytów częściowo skoniugowanych z antygenem białkowym dla wzmożenia ich immunogenności i przełamania autotolerancji. Przywrócenie autotolerancji było prowadzone przez podanie dożylne syngenicznych erytrocytów tydzień przed immunizacją zwierząt antygenami krwinek

czerwonych. Równocześnie wyizolowano od myszy toleryzowanych syngenicznymi erytrocytami limfocyty T supresyjne do hodowli komórkowej i z nadsączu otrzymano egzosomy, które następnie podano dootrzewnowo osobnikom w objawowej fazie reakcji DTH, co doprowadziło do istotnego złagodzenia objawów autoimmunizacji. Podobnie, inkubacja komórek efektorowych z otrzymanymi egzosomami skutkowała zahamowaniem u biorców adoptywnie transferowanej reakcji DTH na autoantygeny. Natomiast inkubacja egzosomów z cząsteczkami antagonistycznymi do miR-150 blokowała ich aktywność supresyjną. Obserwacje te udowodniły możliwość indukcji tolerancji mediowanej przez limfocyty T supresyjne oraz supresji aktywnego procesu autoimmunizacyjnego przez podanie terapeutyczne egzosomalnego miR-150. W kolejnej pracy oceniono potencjał terapeutyczny egzosomalnego miR-150 w mysim modelu reakcji DTH indukowanej owoalbuminą. Myszom podano drogą dootrzewnową, dożylną, śródskórną lub dożołądkową zawiesinę egzosomów w dniu wywołania objawów reakcji DTH lub 24 godziny po wywołaniu obrzęku małżowiny usznej. W obu punktach czasowych zaobserwowano istotną supresję reakcji DTH, jednocześnie stwierdzając największą efektywność terapeutyczną pęcherzyków podanych dożołądkowo. Swoistość antygenowa aktywności egzosomalnego miR-150 została ponownie potwierdzona poprzez ocenę potencjału supresyjnego populacji pęcherzyków wypłukanej z kolumny chromatograficznej wypełnionej sefarozą skoniugowaną z białkiem jaja kurzego. Rolę kierowania swoistością przez łańcuchy lekkie przeciwciał w tej reakcji udowodniono poprzez doświadczenia, w którym egzosomy otrzymane od myszy toleryzowanych na owoalbuminę inkubowano z peptydami owoalbuminowymi przed ich dodaniem do komórek efektorowych, co skutkowało zablokowaniem ich zdolności do zahamowania adoptywnie transferowanej reakcji DTH na białko jaja kurzego. Następnie, Autorka zajęła się rolą makrofagów prezentujących antygen w badanych zjawiskach autoimmunizacji. Habilitantka zauważyła, że u zwierząt pozbawionych makrofagów nie stwierdza się supresji reakcji DTH na owoalbuminę. Biorąc pod uwagę wcześniejsze obserwacje, iż łańcuchy lekkie obecne na egzosomach zawierających cargo z miR-150 wiążą determinanty antygenowe prezentowane przez makrofagi w kontekście MHC, Autorka wysnuła hipotezę, iż tolerogenne właściwości egzosomów zależą właśnie od ich interakcji z makrofagami prezentującymi antygeny. Dokładniejsza charakterystyka takich makrofagów stanowiła kolejny etap osiągnięcia. Autorka wykazała, iż makrofagi traktowane egzosomalnym miR-150 wydzielają własne pęcherzyki o aktywności supresyjnej względem limfocytów T efektorowych, które także zawierają miR-150. Pęcherzyki wydzielane przez stymulowane egzosomalnym miR-150 komórki prezentujące antygen są przekazywane w synapsie immunologicznej limfocytom T rozpoznającym

swoiście (przez receptor TCR) antygen prezentowany przez makrofagi. Pęcherzyki te mogą wykorzystywać IgG do agregowania, co wzmacnia ich aktywność biologiczną.

Osiągnięcie zostało zrekapitulowane w pracy przeglądowej w piśmie Frontiers in Cell and Developmental Biology (oraz zgłoszeniu patentowym PCT/PL2021/050069). Najważniejszymi wnioskami są:

- wykazanie kluczowej roli łańcuchów lekkich przeciwciał, wydzielanych przez limfocyty B1 i opłaszczających transportujące miR-150 egzosomy limfocytów T supresyjnych w zapewnieniu swoistości antygenowej oddziaływania pęcherzyków na komórki prezentujące antygen poprzez wiązanie determinant antygenowych prezentowanych w kontekście MHC klasy II;

- wskazanie możliwości manipulacji swoistością działania tolerogennego egzosomów poprzez ich opłaszczanie antygenowo-swoistymi łańcuchami lekkimi przeciwciał;

- udowodnienie, iż makrofagi prezentujące antygen są komórkami docelowymi dla działania egzosomalnego miR-150;

- odkrycie zjawiska agregacji pęcherzyków wykazujących ekspresję MHC klasy II z zastosowaniem antygenowo-swoistych przeciwciał IgG, która w istotny sposób wzmaga aktywność tolerogenną i terapeutyczną pęcherzyków transportujących immunoregulacyjny miR-150.

c. Poprawność formułowania problemów i hipotez

Hipotezy formułowane są przez Habilitantkę w pracach poprawnie. Autorka buduje kolejne hipotezy na wynikach poprzednich prac zespołu i weryfikuje je używając adekwatnych narzędzi laboratoryjnych. Przedstawiony cykl prac stanowi cenną wiedzę dotyczącą podstawowych problemów z zakresu tolerancji immunologicznej. Niezwykle cenne jest użycie nie tylko modeli in vitro, ale także zaawansowanych modeli zwierzęcych.

d. Ocena metodologiczna pracy

Użycie zaawansowanych technik immunologii komórkowej i molekularnej oraz modeli zwierzęcych pozwalają na bardzo przekrojowe ustosunkowanie się do podnoszonych problemów badawczych. Możliwości badania nowych zjawisk przy pomocy kilku modeli zwiększają prawdopodobieństwo, iż wysnute wnioski są prawdziwe.

II. Ocena dorobku

Sumaryczny IF Pani doktor Nazimek wynosi **105.** Poza cyklem 5 prac będących podstawą do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego, dorobek naukowy obejmuje 43 prace, z czego 22 artykuły to prace oryginalne. W 24 pracach jest pierwszym autorem. Według Web of Science Core Collection liczba cytowań wynosi: **620** (bez autocytowań: 496), a Index Hirscha wynosi **14**. Jest autorem lub współautorem ponad 60 doniesień pokonferencyjnych z 15-stu specjalistycznych konferencji naukowych.

Zainteresowania naukowe i staże w ośrodkach naukowych Habilitantki są związane od początku kariery z funkcją zewnątrzkomórkowych pęcherzyków błonowych oraz cząsteczek miRNA w mechanizmach odpornościowych, ze szczególnym uwzględnieniem tolerancji immunologicznej, reakcji alergicznych oraz procesów autoimmunizacji. Zainteresowania te rozwijała w Yale School of Medicine, New Haven, stany Zjednoczone (3 lata) i Universidad Autónoma de Madrid, Hiszpania (kilka kilkumiesięcznych pobytów w tym w ramach EMBO Short Term Fellowship). Tematyka tolerancji znalazła też wyraz w grancie PRELUDIUM 5 Narodowego Centrum Nauki, którego Habilitantka była kierownikiem.

W trakcie swojej dotychczasowej pracy naukowej odejmowała także tematy związane z funkcją limfocytów B1a w odporności przeciwzakaźnej, możliwościami regeneracji uszkodzonego rdzenia przez podanie pęcherzyków wydzielonych przez mezenchymalne komórki macierzyste, dotyczące oddziaływania wybranych leków o różnych wskazaniach klinicznych na mechanizmy odporności wrodzonej i nabytej. Opisała oddziaływanie antydepresantów na funkcjonowanie układu immunologicznego, co zostało uhonorowane Nagrodą im. Tadeusza Browicza Polskiej Akademii Umiejętności w 2017 roku. Uzyskała także kilka innych prestiżowych nagród: Bright Sparks Award podczas VI Europejskiego Kongresu Immunologicznego oraz „Doctus – Małopolski fundusz stypendialny dla doktorantów". W 2015 i 2018 roku, podczas Europejskich Kongresów Immunologicznych w Wiedniu i w Amsterdamie była laureatką EFIS Travel Grant. Podczas 5th Warsaw Conference on Perspectives of Molecular Oncology we wrześniu 2020 roku przedstawiła na zaproszenie Organizatorów Konferencji wykład pt. „Perspectives in manipulating EVs for therapeutic applications".

Od 2020 roku jest członkinią Rady Naukowej czasopisma AIMS Allergy and Irnmunology, a od 2021 roku Rady Naukowej czasopisma ExRNA. Pełniła rolę Guest-Editor w International Journal of Molecular Sciences i AIMS Allergy and lmmunology. Była

recenzentem artykułów naukowych w 9 czasopismach z listy JCR oraz aplikacji grantowych dla Foundation against Cancer Belgium w 2020 roku oraz dla Dutch Research Council w 2021 roku.

Oprócz grantów finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki oraz MNiSW, pełniła też funkcję kierownika trzech projektów finansowanych z dotacji celowej MNiSW dla młodych naukowców oraz jednego projektu z subwencji na działalność badawczą MEiN oraz była wykonawcą w sześciu projektach finansowanych z dotacji statutowej MNiSW oraz z subwencji MEiN na utrzymanie i rozwój potencjału badawczego UJ CM

W odniesieniu do działalności dydaktycznej, Habilitantka od roku akademickiego 2014/2015 prowadzi zajęcia z przedmiotu Immunologia oraz zajęcia fakultatywne dla studentów kierunku lekarskiego, lekarsko-dentystycznego, dietetyki, farmacji i analityki medycznej Wydziału Lekarskiego, Wydziału Farmaceutycznego oraz Szkoły Medycznej dla Obcokrajowców UJ CM. Do roku 2021 prowadziła również zajęcia seminaryjne dla studentów kierunku weterynaria, realizowanego przez Uniwersyteckie Centrum Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR. Prowadziła też zajęcia dotyczące sposobów pozyskiwania środków na badania oraz realizacji projektów naukowych dla doktorantów. Znakomite oceny prowadzonych zajęć dydaktycznych przyznane przez studentów zaowocowały przyznaniem Habilitantce Nagrody JM Rektora Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz Zespołowej Nagrody Prorektora UJ ds. Collegium Medicum za dotychczasową działalność dydaktyczną. Od roku akademickiego 2014/2015 jest opiekunem Studenckiego Koła Naukowego przy Katedrze Immunologii UJ CM dla studentów Wydziału Lekarskiego. Dotychczas była promotorem czterech prac magisterskich, recenzentem dwóch prac magisterskich studentów analityki medycznej oraz jednej pracy licencjackiej i jednej pracy magisterskiej studentów kierunku dietetyka I i II stopnia. Od roku akademickiego 2019/2020 pełni funkcję promotora pomocniczego w programie doktorskim lek. Pawła Bryniarskiego w Szkole Doktorskiej Nauk Medycznych i Nauk o Zdrowiu UJ CM.

Jest autorką jednego rozdziału („Podstawy diagnostyki immunologicznej") oraz współautorką dwóch kolejnych rozdziałów („Odżywianie a odporność" oraz „Odporność w otyłości i zespole metabolicznym. Oddziaływanie jelitowej flory mikrobiologicznej") w podręczniku „Immunologia dla studentów wydziałów medycznych i lekarzy", wydanym pod redakcją naukową prof. Krzysztofa Bryniarskiego przez wydawnictwo Edra Urban & Partner w 2017 roku. Podręcznik ten otrzymał Nagrodę Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

W odniesieniu do działalności organizacyjnej i propagatorskiej od 2017 roku pełni funkcję sekretarza Krakowskiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej. W 2021 roku aktywnie uczestniczyła w przygotowaniu zgłoszenia kandydatury Krakowa, jako miasta-gospodarza Europejskiego Kongresu Immunologicznego w 2027 roku. Propaguje też wiedzę w mediach popularnych (wywiad w Magazynie Piątek Dziennika Polskiego), szkołach średnich (wykład w I Liceum Ogólnokształcącym w Krakowie), oraz podczas Festiwali Nauki i Sztuki.

III. Wniosek końcowy

Wniosek habilitacyjny wraz z osiągnięciem naukowym ma układ typowy dla tzw. „nowego trybu habilitacji". Biorąc pod uwagę zaprezentowane osiągnięcie naukowe oraz dorobek stwierdzam, że spełnia on merytoryczne i formalne wymogi stawiane kandydatom do uzyskania stopnia doktora habilitowanego zgodnie z Ustawą Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 roku (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 ze zm.).

W związku z tym wnioskuję do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o nadanie stopnia doktora habilitowanego Pani doktor Katarzynie Nazimek na podstawie osiągnięcia naukowego pt. „Udział makrofagów oraz antygenowo-swoistych przeciwciał i ich łańcuchów lekkich w tolerancji i autotolerancji immunologicznej mediowanej przez egzosomalny miR-150 u myszy" oraz pozostałych osiągnięć naukowych, organizacyjnych i dydaktycznych Habilitantki.

Wartość uzyskanych wyników w kontekście możliwości ich wykorzystania w innych dziedzinach nauk podstawowych oraz możliwe aplikacje kliniczne uprawnia mnie także do wnioskowania o wyróżnienie pracy.

Signed by /
Podpisano przez:

Piotr Trzonkowski

Date / Data:
2022-07-19
16:25