

Autoreferat

1. Imię i nazwisko: **Joanna Skrzeczyńska-Moncznik**
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

| | | |
|------|---|--|
| 1997 | Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie | Dyplom magistra biologii ze specjalnością biologia molekularna |
| 2002 | Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie | Stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii na podstawie rozprawy pt.: „Analiza funkcjonalna monocytów CD16+” wykonanej pod opieką prof. dr hab. Juliusza Pryjmy |

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

| | |
|-------------------|--|
| 2008 - obecnie | Uniwersytet Jagielloński w Krakowie, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Zakład Immunologii, stanowisko: adiunkt |
| 2002-2008 | Uniwersytet Jagielloński w Krakowie, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Zakład Immunologii, stanowisko: asystent |

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.). Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora w zakresie biologii kontynuowałam pracę w Zakładzie Immunologii, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, gdzie zaangażowałam się w realizację projektów dotyczących udziału komórek układu immunologicznego w reakcji zapalnej skóry w przebiegu łuszczycy, tym samym przekierowując częściowo swoje zainteresowania na znaczenie mechanizmów odporności wrodzonej w rozwoju reakcji zapalnej. Prowadzone przeze mnie badania miały charakter badań podstawowych, gdzie modelem doświadczalnym były komórki pierwotne izolowane z krwi obwodowej zdrowych dawców i pacjentów z łuszczycą oraz innymi stanami chorobowymi obejmującymi zmiany skórne. Realizując badania naukowe postawiłam pytanie badawcze dotyczące udziału komórek układu odpornościowego: plazmacytoidalnych komórek dendrytycznych (pDC) oraz neutrofilii w etiologii i postępie zmian typowych dla łuszczycy. Przedstawione przeze mnie osiągnięcie: **Patofizjologia łuszczycy - rola komórek pDC i neutrofilii**, obejmuje 6 prac oryginalnych. Opublikowane wyniki poszerzyły wiedzę na temat znaczenia neutrofilii, obecnych w zmienionej chorobowo skórze u pacjentów z łuszczycą jako komórek łączących i regulujących odpowiedź immunologiczną zależną od mechanizmów wrodzonych i nabytych. Znaczenie tych prac i uznanie środowiska naukowego zaświadcza liczba ich cytowań wynosząca 178 (bez autocytacji). Mój wiodący udział w powstaniu wyników stanowiących osiągnięcie potwierdzają oświadczenia pozostałych współautorów.

4.1. Koncept i cel badań

Podstawą funkcjonowania organizmów żywych jest homeostaza tkanek i narządów, w której utrzymanie są zaangażowane: układ nerwowy, hormonalny i immunologiczny. Rolą układu immunologicznego jest rozpoznanie zagrożenia, mogącego zaburzyć homeostazę organizmu i uruchomienie odpowiedzi mającej na celu jego eliminację. Skóra stanowi naturalną barierę odgraniczającą środowisko zewnętrzne od wewnętrznego środowiska organizmu. Kooperacja dwóch systemów: bariery fizycznej, jaką stanowi anatomia skóry, w tym przestrzenne ułożenie komórek budujących poszczególne warstwy skóry, jak również obecność w niej białek i lipidów oraz bariery immunologicznej, jaką stanowią rezydujące w skórze komórki układu immunologicznego, pozwala na utrzymanie homeostazy skóry. Zaburzenie tego układu może skutkować zmianą ciągłości bariery skórnej i odpowiedzią zapalną, która u osób predysponowanych genetycznie może manifestować się jako łuszczycy. Dane literaturowe wskazują, że obok uwarunkowań

genetycznych także modyfikacje epigenetyczne i czynniki środowiskowe, jak mikroflora skóry i jelit, przebyte infekcje bakteryjne oraz mechaniczne urazy skóry są czynnikami etiologicznymi w łuszczycy (Albanesi et al., 2018; Orsmond et al., 2021).

Łuszczycą jest chorobą o podłożu zapalnym, w którym główną rolę komórek efektorowych odgrywają limfocyty T. Rozwój chronicznej odpowiedzi zapalnej następuje bez obecności patogenów i związany jest z aktywacją keratynocytów i komórek układu immunologicznego (Albanesi et al., 2018; Orsmond et al., 2021). Histologicznie, zmiany łuszczycowe, charakteryzuje zgrubiała warstwa naskórka, wynikająca ze wzmożonej aktywności proliferacyjnej keratynocytów, co przy równoczesnym zaburzeniu ich różnicowania prowadzi do powstawania zmian strukturalnych i funkcjonalnych. W przebiegu łuszczycy, uszkodzenie bariery fizycznej, jaką stanowi struktura naskórka wynika ponadto ze zmienionego repertuaru białek tworzących połączenia międzykomórkowe oraz lipidów obecnych w macierzy zewnątrzkomórkowej warstwy rogowaciejącego naskórka (Orsmond et al., 2021). Rozwój zmian łuszczycowych jest ponadto istotnie zależny od zmian i nieprawidłowej regulacji bariery immunologicznej, związanej zarówno z odpowiedzią wrodzoną, jak i nabytą. Wiadomo, że zmianom na poziomie bariery fizycznej towarzyszy uwalnianie czynników prozapalnych, co inicjuje naciek komórek układu immunologicznego do skóry (Albanesi et al., 2018). Migracja leukocytów krwi obwodowej do zmienionej chorobowo skóry ma miejsce w odpowiedzi na czynniki chemotaktyczne produkowane przez keratynocyty i komórki rezydentne skóry. Komórki identyfikowane w zmienionej chorobowo skórze to przede wszystkim limfocyty CD3⁺, neutrofile, komórki dendrytyczne (pDC i mDC), komórki NK oraz makrofagi. Pojawiające się neutrofile i komórki dendrytyczne, głównie plazmacytoidalne komórki dendrytyczne (pDC) oraz uwalniane przez nie czynniki i cytokiny sprzyjają rozwojowi silnej odpowiedzi prozapalnej, co w konsekwencji prowadzi do aktywacji limfocytów. Neutrofile są komórkami istotnymi dla prawidłowej odpowiedzi odpornościowej. Ich liczba waha się pomiędzy 1.5-8x10⁹/L, komórki te uwalniane są ze szpiku do krwi obwodowej, gdzie stanowią u zdrowych osób około 60% leukocytów krążących. Neutrofile są komórkami bez zdolności do podziałów, a ich czas życia waha się od 6-8h. Komórki te są istotne dla nieswoistej odpowiedzi odpornościowej, a zawarte w ich ziarnistościach enzymy proteolityczne mają znaczenie dla charakterystycznych dla neutrofilii mechanizmów bójących. Obecność granul w cytoplazmie neutrofilii klasyfikuje je jako granulocyty krwi obwodowej, którą to populację tworzą razem z bazofilami i eozynofilami. W przebiegu

łuszczycy, aktywacja komórek efektorowych przede wszystkim limfocytów Th1 i Th17, zależy od wstępnej aktywacji pDC. Komórki pDC są subpopulacją komórek dendrytycznych będącą ważnym źródłem IFN typu I, który produkują w odpowiedzi na kwasy nukleinowe pochodzenia wirusowego czy bakteryjnego, rozpoznawane przez wewnątrzkomórkowe receptory Toll-podobne: TLR-9 i TLR-7 (Santana-de Anda et al., 2013). IFN typu I jest ważnym czynnikiem kierującym dojrzewaniem mieloidalnych komórek dendrytycznych (mDC) i aktywacją naiwnych limfocytów CD4⁺. Prawdopodobnym jest, że zwiększona produkcja IFN typu I może przyczyniać się do rozwoju chorób o podłożu autozapalnym (Akeno et al., 2011).

W świetle przedstawionych powyżej danych podjęłam badania, których celem było wyjaśnienie mechanizmów leżących u podstaw dysfunkcji bariery immunologicznej, sprzyjających zapoczątkowaniu i postępowi reakcji odpornościowej, związanej z powstawaniem zmian zapalnych skóry w przebiegu łuszczycy. Wiadomo, że choroby zapalne skóry o różnej etiologii dzielą pewne cechy, jak udział efektorowych limfocytów czy obecność podobnych chemokin, ale przebieg odpowiedzi immunologicznej jest zależny od typu choroby (Guttman-Yassky et al., 2011a, 2011b). Poznanie mechanizmów regulujących oddziaływanie komórek układu immunologicznego prowadzących do nieprawidłowości i postępu choroby jest kluczowe dla opracowania skutecznych metod leczenia. Realizacja założonego celu wiązała się z postawieniem przeze mnie kilku pytań badawczych, dotyczących zależności pomiędzy komórkami układu odpornościowego naciekającymi zmiany skórne w przebiegu łuszczycy, szczególnie między neutrofilami a komórkami dendrytycznymi i znaczeniu tych interakcji dla postępu choroby.

4.2. Problemy badawcze

4.2.1. Jakie czynniki są istotne dla rekrutacji pDC i innych komórek immunokompetentnych z krwi obwodowej do zmienionej chorobowo skóry w przebiegu chorób o podłożu zapalnym?

Skrzeczynska-Moncznik J, Wawro K, Stefańska A, Oleszycka E, Kulig P, Zabel BA, Sułkowski M, Kapińska-Mrowiecka M, Czubak-Macugowska M, Butcher EC, Cichy J
Potential role of chemerin in recruitment of plasmacytoid dendritic cells to diseased skin. *Bioch Bioph Res Comm* **2009**;380(2):323-327; DOI:
10.1016/j.bbrc.2009.01.071

Skrzeczynska-Moncznik J, Stefańska A, Zabel BA, Kapińska-Mrowiecka M,
Butcher, EC, Cichy J. Chemerin and the recruitment of NK cells to diseased skin. *Acta Biochim Pol* **2009**; 56(2): 355-360

W latach 2005-2007 pojawiły się prace (Lande et al., 2007; Nestle et al., 2005; Pascual et al., 2006) pokazujące udział pDC i produkowanego przez te komórki IFN typu I w rozwoju zmian skórnych w przebiegu tocznia rumieniowatego układowego (SLE) oraz łuszczycy. Pod względem jakościowym i ilościowym, naciek komórek układu immunologicznego do zmienionej chorobowo skóry jest kształtowany przez uwalniane w skórze czynniki chemotaktyczne. Wykazano, że krążące pDC zdrowych dawców charakteryzują się obecnością CXCR3 i CMKLR1 (chemokine-like receptor1) (Vanbervliet et al., 2003; Zabel, Silverio, et al., 2005). Komórki pDC są nieobecne w zdrowej skórze i migrują do tej tkanki w odpowiedzi na konstytutywnie produkowaną chemokinę CXCL12, rozpoznawaną przez CXCR4 oraz prozapalne chemokiny, jak CXCL10 rozpoznawaną przez CXCR3, naciekając zmiany skórne w przebiegu łuszczycy i SLE (Nestle et al., 2005; Vermi et al., 2005). Opublikowane dane wskazują, że pDC posiadają funkcjonalny receptor CMKLR1 i w warunkach *in vitro*, mogą migrować w odpowiedzi na obecność chemeryny (Vermi et al., 2005, 2009; Wittamer et al., 2003; Zabel, Silverio, et al., 2005). Chemeryna jest białkiem o masie 18kDa, uwalnianym w postaci prekursora, którego obecność stwierdza się w osoczu i tkankach. Doświadczenia naszej grupy (Kulig et al., 2007) i innych (Du et al., 2009; Wittamer et al., 2005; Zabel, Allen, et al., 2005) pokazały, że chemeryna jest aktywna chemotaktycznie po hydrolizie wiązania peptydowego od strony C-końca formy prekursorowej. Proteoliza może być prowadzona przez pochodzące od gospodarza proteazy serynowe, karboksypeptydazy oraz bakteryjne proteiny cysteinowe. Punktem wyjścia do prowadzonych przeze mnie badań była obserwacja, która wskazywała, że pomimo podobnego profilu chemokin produkowanych przez zmienioną zapalnie skórę w przebiegu łuszczycy i atopowego zapalenia skóry (AZS), komórki pDC rzadko są widoczne w zmianach skórnych pacjentów z AZS (Guttman-Yassky et al., 2007; Wollenberg et al., 2002). Interesującym było poznanie, jaki mechanizm pozwala na selektywną rekrutację pDC w przebiegu łuszczycy. Badanie na materiale klinicznym rozpoczęłam od oceny odsetka komórek pDC we krwi pacjentów grupy kontrolnej, pacjentów z AZS i łuszczycą, co zgodnie z oczekiwaniami i dostępną literaturą pokazało, że odsetek pDC, definiowanych w oparciu o ekspresję CD123 (receptor dla IL-3) oraz BDCA-2, w populacji komórek

jednojądrzastych jest istotnie zmniejszony we krwi pacjentów z łuszczycą. Prawdopodobnym jest, że różnica udziału pDC w populacji krążących leukocytów wskazuje na różne zachowania migracyjne komórek pDC, obserwowane w przebiegu porównywanych chorób zapalnych skóry. Próbując znaleźć mechanizm istotny dla selektywnej migracji pDC w przebiegu łuszczycy w pierwszej kolejności zapytałam o poziom ekspresji receptorów dla dwóch kluczowych chemokin – CXCL10 oraz chemeryny. Uzyskane wyniki nie wskazywały różnic w poziomie ekspresji CXCR3 oraz CMKLR1 na powierzchni pDC pacjentów grupy kontrolnej, pacjentów z AZS oraz łuszczycą, i nie pozwoliły wytłumaczyć różnej migracji pDC w AZS i łuszczycy. W kolejnym doświadczeniu zweryfikowałam zatem funkcjonalność powyższych receptorów. W modelu doświadczalnym wykorzystującym system migracji *in vitro* w odpowiedzi na CXCL12, kombinację CXCL10/CXCL12 oraz ligand dla CMKLR1 – chem SspB, tj. poddaną proteolitycznej obróbce chemerynę, zbadalam zdolność pDC do odpowiedzi na obecne w środowisku czynniki chemotaktyczne. Wyniki pokazały obecność funkcjonalnych receptorów CXCR3, CXCR4 oraz CMKLR1. Ważną obserwacją było uzyskanie efektu synergistycznego działania chemokin, kiedy dodanie chemeryny do każdego ze stosowanych w doświadczeniu chemoatraktantów - czy CXCL10, czy CXCL12 istotnie zwiększała zdolność pDC do migracji. Ten wynik był wyraźną przesłanką do dokładniejszego sprawdzenia, czy to właśnie chemeryna jest czynnikiem krytycznym dla obserwowanej w przebiegu łuszczycy migracji pDC do zmienionej chorobowo skóry. Dostęp do skrawków skórnych pacjentów z AZS i łuszczycą pozwolił nam na pokazanie metodą Western blot obecności prekursorowej formy chemeryny pełnej długości, przede wszystkim w wycinkach skórnych pobranych od pacjentów z łuszczycą. Wynik ten pozostawał w zgodzie z danymi pokazującymi, że podczas łuszczycy zaobserwowano podniesiony poziom mRNA dla chemeryny w skórze zmienionej chorobowo (Nagpal et al., 1997). Zdolność do migracji w odpowiedzi na ekstrakty skórne wykonane z wycinków pobranych od pacjentów z grupy kontrolnej, z AZS i łuszczycą uzupełniła odpowiedź na postawione pytanie, ponieważ tylko ekstrakt skóry z wycinków od pacjentów z łuszczycą wywoływał migracje komórek linii L1.2 transfekowanej transgenem dla receptora CMKLR1. Tym samym, przeprowadzone przez nas badania pokazały, obecność aktywnej formy chemeryny w ekstraktach wykonanych ze skrawków skóry pochodzących od pacjentów z łuszczycą. Uzyskane i przedstawione wyniki wskazują, że **chemeryna może być czynnikiem odpowiedzialnym za selektywny mechanizm migracji pDC do zmienionej chorobowo skóry, obserwowany w przebiegu łuszczycy, ale nie**

atopowego zapalenia skóry. Chemeryna jest czynnikiem chemotaktycznym dla komórek posiadających na swojej powierzchni receptor CMKLR1, którego obecność pokazałam na komórkach pDC pochodzących od pacjentów z łuszczycą, atopowym zapaleniem skóry i zdrowych dawców, które w testach chemotaksji *in vitro* masowo migrowały w odpowiedzi na obecność chemeryny. Wykonana przeze mnie analiza fenotypowa populacji komórek jednojądrzastych wykazała, że receptor CMKLR1 jest też obecny na komórkach CD3⁻, co było zgodne z wcześniejszymi danymi literaturowymi pokazującymi ekspresję CMKLR1 na komórkach NK (Parolini et al., 2007). Komórki NK są heterogenną populacją różniącą się poziomem ekspresji markera CD56 i obecnością receptora CD16. Komórki CD56^{high}CD16⁻ charakteryzują się fenotypem istotnym dla ich właściwości immunoregulatorowych, w odróżnieniu od efektorowych komórek CD56^{dim}CD16⁺ posiadających silne właściwości cytotoksyczne (Montaldo et al., 2013). Rola komórek NK w rozwoju i postępie łuszczycy była, i nadal jest słabo poznana. Nieliczne prace pokazywały, że w skórze pacjentów z łuszczycą obecne są komórki NK, CD3⁻CD56^{high}CD16⁻ (Ottaviani et al., 2006), co skłoniło mnie do zbadania odsetka krążących komórek NK u pacjentów z łuszczycą. Przedstawione przeze mnie wyniki wskazują na obecność obu subpopulacji komórek NK w populacji komórek jednojądrzastych krwi pacjentów grupy kontrolnej i grupy z łuszczycą. Rozpoczynając analizy zakładałam, że podobnie jak w przypadku pDC naciek do zmienionej chorobowo skóry może skutkować zmniejszeniem populacji NK CD56^{high}CD16⁻ we krwi, jednak uzyskane wyniki nie potwierdziły mojej hipotezy. Odsetek komórek NK CD56^{high}CD16⁻ we krwi był porównywalny pomiędzy grupami pacjentów, podobnie nie zaobserwowałam różnic w odsetku komórek NK CD56^{low}CD16⁺ pomiędzy populacją komórek krwi grupy kontrolnej i pacjentów z łuszczycą. Powyższy wynik pozwolił wnioskować o innym mechanizmie regulującym migrację pDC i komórek NK do skóry. Odwołując się do danych pokazujących obecność receptora dla chemeryny na powierzchni komórek NK w kolejnym kroku zapytałam czy komórki, izolowane od pacjentów grupy kontrolnej i pacjentów z łuszczycą, migrują w warunkach *in vitro* w odpowiedzi na ten chemoatraktant. Chemeryna indukowała migrację wyłącznie komórek NK CD56^{low}CD16⁺, które migrowały również w odpowiedzi na inne chemoatraktanty związane ze stanem zapalnym skóry – CXCL10 i CXCL12, co potwierdza wyniki pokazujące obecność CXCR3 i CMKLR1 na tych komórkach (Ottaviani et al., 2006; Parolini et al., 2007). Jednocześnie uzyskane przeze mnie wyniki pokazały brak migracji populacji komórek NK CD56^{high}CD16⁻ w odpowiedzi na chemerynę, jednakże zdolne były do migracji w obecności CXCL10 i CXCL12. Wzór

migracji zaobserwowany w przedstawionych przeze mnie wynikach nie różnił się pomiędzy grupami pacjentów. Powyższy wynik udowodnił, że w odróżnieniu od pDC migracja komórek NK do skóry pacjentów z łuszczycą nie zależy od obecności w niej chemeryny. Na tej podstawie odrzuciłam hipotezę o możliwej roli chemeryny w kolokalizacji komórek pDC i NK w chorobowo zmienionej skórze w przebiegu łuszczycy, pomimo, że taką zależność pokazano dla zmian liszajowatych w jamie ustnej (Parolini et al., 2007). Przedstawione powyżej wyniki przyniosły częściową odpowiedź na postawione pytanie badawcze pokazując, że obok CXCL10, także **aktywna chemotaktycznie chemeryna ma znaczenie dla rekrutacji do skóry komórek pDC, jednakże inne chemokiny będą miały znaczenie dla napływu komórek NK do objętej stanem zapalnym skóry w przebiegu łuszczycy.** Wiedza, że do powstania aktywnej chemotaktycznie formy chemeryny mogą przyczyniać się neutrofile (Wittamer et al., 2005), pojawiające się w skórze na samym początku rozwoju choroby, i obecne w ich ziarnistościach enzymy proteolityczne nasunęła kolejne pytania, jakie znaczenie mają neutrofile na kolejnych, zależnych od pDC, etapach rozwoju łuszczycy.

4.2.2. Czy rekrutowane do skóry pacjentów z łuszczycą neutrofile wpływają na odpowiedź zależną od pDC?

Skrzeczynska-Moncchnik, J, Włodarczyk A, Zabiegło K, Kapinska-Mrowiecka M, Marewicz E, Dubin A, Potempa J, and Cichy J. Secretory Leukocyte Proteinase Inhibitor-Competent DNA Deposits Are Potent Stimulators of Plasmacytoid Dendritic Cells: Implication for Psoriasis. *Journal of Immunology* **2012**;189(4):1611-7; DOI: 10.4049/jimmunol.1103293

Skrzeczynska-Moncchnik J, Włodarczyk A, Banaś M, Kwitniewski M, Zabiegło K, Kapińska-Mrowiecka M, Dubin A, Cichy J. DNA structures decorated with cathepsin G/secretory leukocyte proteinase inhibitor stimulate IFN α production by plasmacytoid dendritic cells. *Am J Clin Exp Immunol* **2013**; 2(2):186-194.

Skrzeczynska-Moncchnik J, Zabiegło K, Bossowski JP, Osiecka O, Włodarczyk A, Kapinska-Mrowiecka M, Kwitniewski M, Majewski P, Dubin A, Cichy J. Eosinophils Regulate Interferon Alpha Production in Plasmacytoid Dendritic Cells

Stimulated with Components of Neutrophil Extracellular Traps. *J Interferon Cytokine Res.* **2017**;37(3):119-128; DOI: 10.1089/jir.2016.0036.

Jak pokazują dane literaturowe pDC i produkowany przez te komórki, IFN typu I uważa się za główny czynnik indukujący rozwój odpowiedzi immunologicznej prowadzącej do postępu reakcji zapalnej i zaostrzenia zmian w przebiegu łuszczycy oraz chorób o podłożu autoimmunizacyjnym (Garcia-Romo et al., 2011; Gilliet & Lande, 2008; Lande et al., 2007; Nestle et al., 2005). Silnym czynnikiem aktywującym komórki pDC jest DNA uwalniane z uszkodzonych keratynocytów, związane z białkami antybakteryjnymi, jak LL37 (Lande et al., 2007). Wiele prac pokazuje, że w skórze pacjentów z łuszczycą poziom ekspresji białek antybakteryjnych jest podniesiony, co wiąże się ze zwiększonym uwalnianiem LL37, β -defensyny i psoriazyny (Takahashi & Yamasaki, 2020). Aktywacja pDC skutkuje wzmożoną produkcją cytokin, istotnych dla nasilenia reakcji zapalnej: IFN- α , IL-6 czy TNF (Mathan et al., 2013). Następstwem takiej aktywacji jest dojrzewanie i aktywacja mDC i regulowane przez mDC różnicowanie naiwnych limfocytów T w prozapalne Th1 i Th17 (Mathan et al., 2013). Tak jak wspomniano wcześniej neutrofile są komórkami, które jako pierwsze są rekrutowane do skóry i innych tkanek, aby pełnić funkcje obronne. Mechanizmy bójcze zależne od neutrofilii związane są z obecnością enzymów umożliwiających powstanie reaktywnych form tlenu, nadtlenków czy proteolizę patogenów obecnych w fagosomach, co skutkuje eliminacją drobnoustrojów kolonizujących daną tkankę. Enzymy istotne dla funkcji neutrofilii są obecne w ziarnistościach ładowanych białkami w czasie procesu granulopoezy, czyli powstawania neutrofilii w szpiku kostnym (Faurischou & Borregaard, 2003). Wyróżnia się kilka typów ziarnistości obecnych w cytoplazmie granulocytów: pierwszorzędowe zawierające proteinazy serynowe, jak elastaza neutrofilowa (NE) i katepsyna G (CatG); drugorzędowe zawierające laktoferynę oraz trzeciorzędowe zawierające żelatynazy (Rosales, 2020). Równocześnie w ziarnistościach i cytoplazmie neutrofilii mogą być obecne inhibitory proteinaz serynowych jak wydzielniczy leukocytarny inhibitor proteinaz (SLPI), α -1-antytrypsyna (α 1PI) czy elafina (Remold-O'Donnell et al., 1989; Rosales, 2020). Uważa się, że obecność inhibitorów hamujących aktywność proteolityczną jest istotna dla kontrolowania procesów komórkowych zależnych od NE (Majewski et al., 2016; Zabiegło et al., 2015). Zewnątrzkomórkowo enzymy proteolityczne, pochodzące z ziarnistości neutrofilii, mogą pojawiać się w następstwie degranulacji oraz uwalniania

zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilowych (NET) (Mitchell et al., 2008; Rosales, 2020; Shao et al., 2019). W przypadku deponowania sieci NET enzymy ziarnistości neutrofili, białka z cytoplazmy i jądra są związane z DNA uwalnianym z jądra neutrofila (Fuchs et al., 2007; Papayannopoulos et al., 2010). Powstawanie sieci NET jest kontrolowane przez oksydazę NADPH katalizującą produkcję reaktywnych form tlenu, NE albo deiminazę peptydyloarginylową (PAD4), enzymy istotne dla degradacji histonów i dekondensacji chromatyny (Björnsdóttir et al., 2015; Brinkmann & Zychlinsky, 2012; Metzler et al., 2014; Wang et al., 2009; Zabieglo et al., 2015). Na DNA, tworzącym szkielet sieci NET, opisano obecność różnych białek w tym NE, katepsyny G czy histonów (Papayannopoulos et al., 2010; Urban et al., 2009). Wyniki pokazane przez nas wskazują, że sieci NET mogą być uwalniane przez neutrofile izolowane z krwi obwodowej zdrowych dawców w warunkach *in vitro* w odpowiedzi na estry forbolu (PMA) oraz surowice pacjentów z łuszczycą. Na sieciach NET uwalnianych w odpowiedzi na PMA obecna była NE oraz jej inhibitor SLPI. Dalszy kierunek realizowanych przeze mnie badań wyznaczyły dwie przesłanki: surowica pacjentów z łuszczycą zawiera czynniki promujące uwalnianie sieci NET, a także, że ilość SLPI widoczna na sieciach NET była zależna od czynnika stymulującego ich uwolnienie. Obecność sieci NET została wcześniej opisana w zmianach skórnych pacjentów z toczniem rumieniowatym układowym (SLE) oraz łuszczycą (Garcia-Romo et al., 2011; Lin et al., 2011). W pierwszym etapie, celem prowadzonych przeze mnie badań była weryfikacja hipotezy, że sieci NET z obecnymi na nich NE i SLPI będą indukowały odpowiedź pDC. Planowane przeze mnie badania *in vitro* zostały poprzedzone analizą skrawków skórnych, która potwierdziła, że w skórze pacjentów z łuszczycą są obecne neutrofile zawierające w ziarnistościach NE i/lub katepsynę G oraz SLPI, dodatkowo SLPI był widoczny na uwolnionych w skórze sieciach NET. Poza tym zaobserwowano, że pDC, które migrują do skóry pacjentów z łuszczycą lokalizują się blisko neutrofili lub sieci NET. Ta obserwacja była istotna dla podjęcia przeze mnie badań i uzasadniała poszukiwanie odpowiedzi na pytanie czy bliskie sąsiedztwo neutrofili i pDC ma znaczenie dla możliwej interakcji tych komórek lub deponowanych przez neutrofile sieci NET z komórkami pDC. W warunkach *in vitro* do stymulacji pDC, izolowanych z krwi obwodowej zdrowych dawców, wykorzystałam DNA, pochodzące z neutrofili, wcześniej inkubowane z NE i SLPI, co prowadziło do stworzenia, tzw „sztucznej” sieci NET: NE/SLPI/DNA. W odpowiedzi na obecność DNA dekorowanego NE i SLPI komórki pDC zwiększały ekspresję genów IFNA1, IFNA2, IFNA6 i IFNA8 oraz IFNB, jak również uwalniały INF- α . Rozpoznanie czynnika indukującego produkcję IFN typu I było zależne

od TLR-9. Samo DNA, DNA z dodatkiem tylko SLPI lub tylko NE nie było immunogenne. Uzyskane przeze mnie wyniki sugerowały, że pDC mogą rozpoznawać własne DNA, które staje się immunogenne po związaniu białek pochodzących z ziarnistości neutrofilii jak NE oraz z ziarnistości neutrofilii lub keratynocytów, jak SLPI. Na podkreślenie zasługuje fakt, że aktywacja pDC mierzona ilością uwalnianego IFN typu I po rozpoznaniu „imitacji” sieci NET (NE/SLPI/DNA), była większa w porównaniu do odpowiedzi na DNA związane z peptydem LL37, którego działanie indukujące aktywację pDC zostało wcześniej opisane (Gilliet & Lande, 2008; Lande et al., 2007). W kolejnym kroku postanowiłam sprawdzić, jak skład jakościowy przygotowanych w warunkach laboratoryjnych „sztucznych” sieci NET i kompozycja białek na DNA wpływa na ich zdolność do indukcji odpowiedzi komórek pDC. Na wstępie podjęłam działania mające określić czy aktywność proteolityczna NE jest ważna dla interakcji w/w komponentów tworzących „sztuczną” sieć NET. Zastosowanie analogu NE z modyfikacją pozbawiającą NE aktywności enzymatycznej czy użycie innego białka ziarnistości, strukturalnie podobnego do NE, ale bez aktywności proteiny – azurocydyny, do przygotowania „sztucznej” sieci NET, pomimo obecności SLPI, skutkowało brakiem odpowiedzi pDC mierzonej produkcją IFN typu I. Otrzymany przeze mnie wynik wskazywał, że niektóre białka, jak azurocydyna, mogą być obecne na sieciach NET, co pokazały wcześniejsze badania proteomiczne (Urban et al., 2009), ale nie przyczyniają się do rozpoznania sieci NET przez pDC i promowania odpowiedzi zapalnej. W dalszych doświadczeniach do stworzenia kompleksu z DNA wykorzystałam inny enzym pochodzący z ziarnistości neutrofilii, którego obecność również została pokazana na sieciach NET, czyli katepsynę G (Urban et al., 2009). Utworzony kompleks katepsynaG/SLPI/DNA, był efektywny w indukcji odpowiedzi pDC mierzonej ekspresją i uwalnianiem IFN typu I. Co ciekawe mierzona przeze mnie aktywacja pDC i ilość uwolnionego do podłoża hodowlanego IFN α była różna dla NE/SLPI/DNA i CatG/SLPI/DNA, co umacniało tezę, że skład jakościowy sieci NET ma znaczenie dla odpowiedzi pDC. W ostatnim kroku podjęłam się przygotowania i przeprowadzenia doświadczeń potwierdzających znaczenie SLPI obecnego w kompleksie NE/SLPI/DNA lub CatG/SLPI/DNA dla aktywacji pDC. Pokazałam, że wstępne obniżenie zdolności SLPI do hamowania aktywności proteinazowej nie zmieniało immunogenności kompleksu, który tworzył z NE i DNA. Jednakże w modelu, gdzie w miejsce SLPI wykorzystywałam inny inhibitor NE, α 1PI lub antychymotrypsynę, nie obserwowałam aktywacji pDC i produkcji IFN typu I. Na podstawie opisanych wyników mogłam postulować, że **skład białek dekorujących sieci NET, a przede wszystkim obecność na nich SLPI**

i aktywnej enzymatycznie NE lub katepsyny G był kluczowy, dla przełamania tolerancji i odpowiedzi na własne DNA. Należy podkreślić, że uzyskane wyniki badań *in vitro* opisały **mechanizm interakcji komórek pDC i neutrofilii oparty na rozpoznaniu sieci NET z obecnym na nich SLPI**, a tym samym wytłumaczyły znaczenie obserwowanej w skórze pacjentów z łuszczycą ko-lokalizacji w/w komórek. Produkowany przez pDC IFN typu I zwiększa przeżywalność pDC oraz ma znaczenie dla aktywacji i dojrzewania mDC, profesjonalnych komórek prezentujących antygen, i tym samym pośrednio prowadzi dalej do uruchomienia odpowiedzi zależnej od limfocytów (Mathan et al., 2013). Wiadomo również, że pDC posiadają na swojej powierzchni antygeny zgodności tkankowej, MHC klasy II oraz cząsteczki kostymulujące, jak CD80, CD86 czy CD83, który to fenotyp jest wyraźnie widoczny na aktywowanych pDC, zdolnych do bezpośredniej interakcji z limfocytami (Guéry & Hugues, 2015; Mathan et al., 2013). W kolejnej serii prowadzonych doświadczeń podjęłam się zbadania czy rozpoznanie „sztucznych” sieci NET indukuje dojrzewanie pDC manifestujące się zmianą fenotypu i ilościową zmianą poziomu antygenów powierzchniowych. Istnieją doniesienia, które wskazują, że fenotyp aktywowanych pDC charakteryzuje się z zwiększonym poziomem ekspresji cząsteczek kostymulujących (Mathan et al., 2013). Analiza cytofluorymetryczna obecności na powierzchni pDC cząsteczek CD80 i CD86 po inkubacji z NE/SLPI/DNA nie wykazała zmian. Taki wynik sugeruje, że rozpoznanie „sztucznych” sieci NET w wykorzystywanym przeze mnie układzie doświadczalnym **wpływa na produkcję IFN typu I, nie stymulując dojrzewania pDC, ocenianego zmianą fenotypu.** Opisane powyżej wyniki zostawiły mnie z pytaniem, jak odpowiedź pDC na składniki sieci NET regulują inne komórki obecne w nacieku do zmienionej chorobowo skóry pacjentów z łuszczycą, co stało się podstawą postawienia kolejnego pytania badawczego. W pierwszej kolejności interesującym wydawało się zwrócenie uwagi na inną subpopulację granulocytów, czyli eozynofile.

4.2.3. Czy odpowiedź pDC zależna od interakcji z sieciami NET jest modulowana przez obecne w zmianach skórnych pacjentów z łuszczycą eozynofile?

Skrzeczynska-Moncznik J, Zabieglo K, Bossowski JP, Osiecka O, Wlodarczyk A, Kapinska-Mrowiecka M, Kwitniewski M, Majewski P, Dubin A, Cichy J.
Eosinophils Regulate Interferon Alpha Production in Plasmacytoid Dendritic Cells Stimulated with Components of Neutrophil Extracellular Traps. *J Interferon Cytokine Res.* **2017**;37(3):119-128; DOI: 10.1089/jir.2016.0036.

Rola eozynofilii w przebiegu łuszczycy nie jest dobrze poznana, jednak są dane pokazujące obecność tych komórek w skórze pacjentów z łuszczycą (Lundin et al., 1990). Środowisko zapalne zmienionej chorobowo skóry, a w szczególności podniesiony poziom IL-17 czy IL-23 może sprzyjać aktywacji eozynofili i uwalnianiu obecnych w ich ziarnistościach mediatorów zapalnych (Cheung et al., 2008). Eozynofile są komórkami zaangażowanymi w odpowiedź wrodzoną, którą regulują poprzez uwalnianie granule cytotoksyczne zawierające białka kationowe jak białko zasadowe eozynofili (MBP), białko kationowe eozynofili (ECP) czy neurotoksynę z eozynofili (Nakajima et al., 1999; Sastre et al., 2018). Drugi opisany mechanizm zależy od produkowanych przez eozynofile chemokin i cytokin, jak IL-8 czy MCP1 (Cheung et al., 2008). Zaproponowane doświadczenia oparłam na wynikach, że w skórze pacjentów z łuszczycą widoczne są eozynofile, identyfikowane jako komórki ECP-pozytywne, które zajmowały miejsce w sąsiedztwie sieci NET. W modelu doświadczalnym *in vitro* wykorzystałam NE/SLPI/DNA, które stymulowało uwalnianie IFN typu I z pDC, a inkubację z czynnikiem aktywującym pDC prowadziłam w obecności autologicznych eozynofilii. Eozynofile, w czasie 24-godzinnej stymulacji pDC powodowały znaczne obniżenie ilości uwalnianego IFN typu I, a efekt ten był zależny od proporcji pDC i eozynofili w hodowli. Analiza ekspresji IFN typu I na poziomie transkryptu wykazała, że spośród kilku weryfikowanych podtypów IFN typu I, zmianie ulega poziom transkryptu dla IFNA2, a nie IFNB. Opisane przeze mnie zjawisko było selektywne dla eozynofili, a dodanie do mieszaniny pDC i NE/SLPI/DNA innych komórek, jak neutrofile lub komórki jednojądrzaste nie wpływało na produkcję IFN typu I. W kolejnych doświadczeniach postanowiłam zapytać o mechanizm zależnej od eozynofilii regulacji uwalniania IFN α przez pDC. W pierwszej kolejności udowodniłam, że obniżenie ilości uwalnianego IFN α nie zmienia żywotności pDC w ko-hodowli z eozynofilami, co mogłoby wynikać z bezpośredniego oddziaływania eozynofili na pDC lub być konsekwencją mniejszej ilości IFN typu I w środowisku. Pytając dalej o charakter interakcji pomiędzy pDC i eozynofilami pokazałam, że czynnik regulujący uwalnianie IFN α pojawia się podczas hodowli i jest obecny w sekretomie eozynofili, ponieważ fizyczne rozdzielanie komórek i umożliwienie oddziaływania wyłącznie poprzez cząsteczki uwalniane do medium hodowlanego dalej prowadziło do hamowania produkcji IFN α . Analizując repertuar enzymów obecnych w ziarnistościach eozynofili nie mogłam wykluczyć, że możliwa jest degradacja „sztucznej” sieci NET przez enzymy uwalniane przez te komórki. Wykazałam, że mechanizm prowadzący do zmniejszenia produkcji IFN α w obecności

eozyneofili był wybiórczy dla DNA związanego z NE/SLPI lub CatG/SLPI, podczas gdy produkcja IFN α , w odpowiedzi na inne czynniki stymulujące, również zawierające DNA, jak CpG oraz LL37/DNA, nie była zmieniona. Wynik ten pozwolił mi pośrednio wnioskować o braku enzymów o aktywności DNA-zowej w sekretomie eozyneofili, a moja obserwacja została potwierdzona przez nas podczas oceny elektroforetycznej, wskazujcej na brak degradacji DNA przez nadsącz z nad eozyneofili. W drugiej kolejności zapytałam, czy obecność eozyneofili i uwalnianych przez nie czynników zmienia fenotyp pDC. Znanym z literatury faktem jest, że aktywacja pDC może skutkować nasileniem produkcji IFN typu I i/lub zmianą poziomu ekspresji cząsteczek kostymulujcych istotnych dla aktywacji limfocytów (Mathan et al., 2013). Wiadomo, że struktura dwóch związkw CpG, będcych agonistami receptora TLR-9 przyczynia się do tego, że mogą wybiórczo zwiększać uwalnianie IFN typu I, bez zmiany fenotypu, jak CpG-A lub wpływać na dojrzewanie pDC bez uwalniania IFN typu I jak CpG-B ((Rothenfusser et al., 2004). Kolejny raz zapytałam w swojej pracy o fenotyp pDC po aktywacji przez NE/SLPI/DNA w obecności eozyneofili i zaobserwowałam, że obniżeniu produkcji IFN α nie towarzyszy zmiana na poziomie cząsteczek kostymulujcych CD80 i CD86. Podsumowując, badając możliwy **udział eozyneofili i produkowanych przez nie czynników w regulacji odpowiedzi zapalnej w przebiegu łuszczycy** pokazałam, że **hamujca odpowiedź pDC aktywność eozyneofili, zależy od czynników uwalnianych do środowiska zewnętrznego i obejmuje produkcję IFN α , ale nie moduluje dojrzewania pDC**. Otrzymane wyniki pozwoliły na wyciągnięcie wniosków, że obecność eozyneofili w zmienionej chorobowo skórze w przebiegu łuszczycy kontroluje odpowiedź wrodzoną i nie wpływa na włączenie limfocytów i przełączenie reakcji odpornościowej w kierunku odpowiedzi nabytej. Przeprowadzone przeze mnie wyniki wskazywały, że istotnym elementem warunkujcym aktywację pDC są sieci NET, które uwalniane są przez neutrofile. Doniesienia wskazujce na heterogenność populacji neutrofile i pojawianie się tzw. neutrofile niskiej gęstości (LDG) w przebiegu chorób o podłożu autoimmunizacyjnym, zapalnym czy nowotworowym (Carmona-Rivera & Kaplan, 2013; Deng et al., 2016; Denny et al., 2010; Scapini et al., 2016), skierowało moja uwagę na badanie heterogenności neutrofile w przebiegu łuszczycy.

4.2.4. Czy neutrofile obecne w krążeniu pacjentów z łuszczycą i naciekające zmienioną chorobowo skórę są populacją heterogenną?

Skrzeczynska-Moncznik J, Zabieglo K, Osiecka O, Morytko A, Brzoza P, Drożdż Ł, Kapinska-Mrowiecka M, Korkmaz B, Pastuszczak M, Kosalka-Węgiel J, Musiał J, Cichy J. Differences in Staining for Neutrophil Elastase and its Controlling Inhibitor SLPI Reveal Heterogeneity among Neutrophils in Psoriasis. *J Invest Derm.* **2020**;37(3):119-128; DOI: 10.1016/j.jid.2019.12.015

Jak wspominałam wcześniej, neutrofile są ważne jako pierwsza linia obrony przed mikroorganizmami: rozpoznają i niszczą patogeny poprzez fagocytozę, uwalnianie zawartości ziarnistości oraz tworzenie neutrofilowych pułapek zewnątrzkomórkowych (NETs). Klasyczna aktywacja neutrofilii ma miejsce w odpowiedzi na patogeny i uszkodzenia tkanek. Chroniczny stan zapalny związany jest z przedłużoną obecnością czynników wzrostu i sygnałów zapalnych, co ma miejsce w przypadku zmian nowotworowych i chorób autoimmunologicznych. W przypadku stanu zapalnego bez udziału czynników mikrobiologicznych, wraz z dojrzałymi komórkami linii mieloidalnej mogą pojawić się komórki regulatorowe pochodzenia mieloidalnego (myeloid-derived regulatory cells - MDR) (Scapini et al., 2016). Obecność takich komórek posiadających fenotyp neutrofilii opisano w wielu stanach patologicznych, w tym w chorobach autoimmunologicznych i autozapalnych czy nowotworach (Deng et al., 2016; Denny et al., 2010; Scapini et al., 2016). Podstawową cechą różniącą klasyczne neutrofile (PMN) i neutrofile niskiej gęstości (LDG) jest ich gęstość właściwa skutkująca sedymentacją PMN po izolacji w gradiencie gęstości razem z erytrocytami, podczas gdy LDG są obecne we frakcji komórek jednojądrzastych. Inna gęstość może być związana z inną morfologią LDG i obecnością jądra z mniejszą liczbą segmentów, co charakteryzuje komórki mniej dojrzałe, uwalniane ze szpiku przez zakończeniem różnicowania (Villanueva et al., 2011). Inna teoria wskazuje, że zmieniona gęstość komórek związana jest ze wstępną aktywacją i degranulacją neutrofilii (McKenna et al., 2009). Wyniki ostatnich lat postulują, że LDG mogą zawierać zarówno niedojrzałe jak i dojrzałe komórki, a kompozycja tej populacji będzie zależna od środowiska związanego ze stanem chorobowym (Scapini et al., 2016). W wykonanych przeze mnie oznaczeniach **zaobserwowałam obecność zwiększonego odsetka populacji LDG we frakcji komórek jednojądrzastych krwi obwodowej pacjentów z łuszczycą** w porównaniu do krwi pobranej od zdrowych dawców, co było

zgodne z wcześniejszymi doniesieniami (Teague et al., 2019). Przeprowadzona przeze mnie analiza fenotypu tych komórek wykazała, że LDG posiadają fenotyp dojrzałych neutrofilów (CD15, CD11b, CD10), a zwiększony poziom CD66b i obniżony poziom CD62L sugerują, że ich stopień aktywacji jest podniesiony w porównaniu z PMN. Wcześniejsze dane (Teague et al., 2019), podobnie jak nasze wyniki pokazały dodatkowo zwiększoną zdolność LDG do spontanicznego uwalniania sieci NET. Taka charakterystyka LDG obecnych u pacjentów z łuszczycą skłoniła mnie do zapytania o mechanizm tego zjawiska. W podjętych badaniach zwróciłam swoją uwagę na białka ziarnistości neutrofilów NE i SLPI, które są istotne dla formowania sieci NET (Metzler et al., 2014; Urban et al., 2009). Barwienie wewnątrzkomórkowe na utrwalonych i permabilizowanych komórkach PMN i LDG pokazało inny wzór barwienia. LDG charakteryzował silniejszy sygnał barwienia pochodzący od NE, ale słabsza immunoreaktywność dla przeciwciał rozpoznających SLPI. Co więcej, obserwacja była niezależna od tego, czy PMN i LDG były izolowane od zdrowych dawców, czy od pacjentów z łuszczycą. W kolejnych oznaczeniach postanowiłam potwierdzić wyniki, otrzymane techniką cytometrii przepływową, oznaczeniami ilości NE i SLPI w lizatach z izolowanych metodą sortowania komórek LDG i PMN. Otrzymane wyniki były dla mnie zaskakujące, ponieważ ilość NE, jak i SLPI w lizatach z PMN i LDG była porównywalna. Na tej podstawie mogłam wnioskować, że obserwowany odmienny wzór barwienia przeciwciałami anti-NE i anti-SLPI w populacji PMN i LDG, definiujący inną immunoreaktywność dla NE i SLPI nie jest związany z różną ilością tych białek w obu subpopulacjach neutrofilów. Wynik potwierdziłam dodatkowo wykonując pomiar aktywności NE, kiedy nie zaobserwowałam istotnych różnic aktywności w lizatach z izolowanych przez sortowanie komórek PMN i LDG. Hipoteza, którą postawiłam mówiła, że inny wzór barwienia przy porównywalnej ilości białka może wiązać się z różną dostępnością antygenów i obecnych na nich epitopów dla przeciwciał. Ten postulat znajdował uzasadnienie w obserwowanym fenotypie LDG, pokazującym większą aktywację, co może skutkować inną dystrybucją NE i uwalnianiem jej z ziarnistości pierwszorzędowych do cytoplazmy. Takie zjawisko ma miejsce na pierwszych etapach formowania sieci NET (Metzler et al., 2014; Zabiegło et al., 2015), ale mogłoby być także następstwem preaktywacji LDG od pacjentów z łuszczycą. Mniejsza immunoreaktywność dla SLPI w tych komórkach może powodować, że część NE obecnej poza ziarnistościami nie podlega kontroli przez wewnątrzkomórkowy inhibitor. Inna lokalizacja NE oraz inna proporcja SLPI/NE w PMN i LDG mogłaby także wpływać na

interakcję NE z jej substratami, na przykład z aktyną, tworzącą cytoszkielet tych komórek. Sugerowane przeze mnie oddziaływanie NE z cytoszkieletem może mieć znaczenie dla zachowań migracyjnych obu populacji neutrofilii. W warunkach *in vitro* wykorzystując system Transwell zbadalam migrację populacji PMN i LDG do chemokiny CXCL1, której ekspresja zwiększa się w przebiegu łuszczycy, formylowanych peptydów pochodzenia bakteryjnego (fMLP) oraz ekstraktów z wycinków skórnych pochodzących od pacjentów z łuszczycą. Obie subpopulacje neutrofilii migrowały w odpowiedzi na badane czynniki chemotaktyczne, jednakże LDG migrowały istotnie słabiej niż PMN w odpowiedzi na fMLP i CXCL1, natomiast lepiej odpowiadały na czynniki obecne w ekstrakcie skórnym. Otrzymany wynik sugeruje, że zarówno PMN, jak i LDG mogą naciekać zmienioną chorobowo skórę i akumulować się w zmianach skórnych pacjentów z łuszczycą, ale skład jakościowy czynników chemotaktycznych może promować migracje PMN i LDG do innych regionów skóry. **Heterogenność populacji neutrofilii manifestuje się odmienną immunoreaktywnością dla NE i SLPI, co może zmieniać ich funkcjonalność, prowadząc do innej aktywności migracyjnej.** Obecność populacji LDG, charakteryzującej się wyższą immunoreaktywnością NE i mniejszą dla SLPI, u pacjentów z łuszczycą może skutkować nasiloną i słabiej kontrolowaną odpowiedzią na sygnały aktywujące, co nasila reakcje zapalną i przyczynia się do postępu choroby.

Podsumowując, najważniejsze **wnioski** płynące z uzyskanych przeze mnie wyników opublikowanych w cyklu publikacji przedstawianych jako osiągnięcie wskazują na:

- **obecność aktywnej chemotaktycznie chemeryny, która może kierować migracją pDC do skóry w przebiegu łuszczycy,**
- **zależność aktywacji pDC od obecności neutrofilii i sieci neutrofilowych (NETs) w skórze pacjentów z łuszczycą**
- **udział proteinaz pochodzących z ziarnistości neutrofilii i ich inhibitora SLPI, obecnych na sieciach neutrofilowych, w indukcji produkcji interferonu typu I przez plazmacytoidalne komórki dendrytyczne (pDC)**
- **znaczenie składu jakościowego sieci NET dla indukcji odpowiedzi pDC**
- **znaczenie sekretomu eozynofili naciekających skórę pacjentów z łuszczycą dla regulacji odpowiedzi pDC na składniki sieci neutrofilowych**
- **obecność zwiększonego odsetka mieloidalnych komórek regulatorowych, jakimi są neutrofilii niskiej gęstości (LDG) w przebiegu łuszczycy**

- **heterogenność populacji krążących neutrofilów w przebiegu łuszczycy definiowaną w oparciu o immunoreaktywność elastazy neutrofilowej (NE) i jej inhibitora SLPI w ziarnistościach i cytoplazmie tych komórek**
- **odmienne właściwości migracyjne subpopulacji neutrofilów związane z obserwowaną heterogennością obejmującą immunoreaktywność dla NE i SLPI**

Przedstawione przeze mnie wyniki i wnioski wskazują na udział komórek pDC i neutrofilów w destabilizacji bariery immunologicznej skóry, co jest kluczowe dla patofizjologii łuszczycy.

4.3. Bibliografia

- Akeno, N., Smith, E. P., Stefan, M., Huber, A. K., Zhang, W., Keddache, M., & Tomer, Y. (2011). IFN- α mediates the development of autoimmunity both by direct tissue toxicity and through immune cell recruitment mechanisms. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *186*(8), 4693–4706. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002631>
- Albanesi, C., Madonna, S., Gisondi, P., & Girolomoni, G. (2018). The Interplay Between Keratinocytes and Immune Cells in the Pathogenesis of Psoriasis. *Frontiers in Immunology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01549>
- Björnsdóttir, H., Welin, A., Michaëlsson, E., Osla, V., Berg, S., Christenson, K., Sundqvist, M., Dahlgren, C., Karlsson, A., & Bylund, J. (2015). Neutrophil NET formation is regulated from the inside by myeloperoxidase-processed reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*, *89*, 1024–1035. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.398>
- Brinkmann, V., & Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin? *Journal of Cell Biology*, *198*(5), 773–783. <https://doi.org/10.1083/jcb.201203170>
- Carmona-Rivera, C., & Kaplan, M. J. (2013). Low-density granulocytes: a distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity. *Seminars in Immunopathology*, *35*(4), 455–463. <https://doi.org/10.1007/s00281-013-0375-7>
- Cheung, P. F. Y., Wong, C. K., & Lam, C. W. K. (2008). Molecular Mechanisms of Cytokine and Chemokine Release from Eosinophils Activated by IL-17A, IL-17F, and IL-23: Implication for Th17 Lymphocytes-Mediated Allergic Inflammation. *The Journal of Immunology*, *180*(8), 5625–5635. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.8.5625>
- Deng, Y., Ye, J., Luo, Q., Huang, Z., Peng, Y., Xiong, G., Guo, Y., Jiang, H., & Li, J. (2016). Low-Density Granulocytes Are Elevated in Mycobacterial Infection and Associated with the Severity of Tuberculosis. *PLOS ONE*, *11*(4), e0153567. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153567>

- Denny, M. F., Yalavarthi, S., Zhao, W., Thacker, S. G., Anderson, M., Sandy, A. R., McCune, W. J., & Kaplan, M. J. (2010). A Distinct Subset of Proinflammatory Neutrophils Isolated from Patients with Systemic Lupus Erythematosus Induces Vascular Damage and Synthesizes Type I IFNs. *The Journal of Immunology*, *184*(6), 3284–3297. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902199>
- Du, X.-Y., Zabel, B. A., Myles, T., Allen, S. J., Handel, T. M., Lee, P. P., Butcher, E. C., & Leung, L. L. (2009). Regulation of Chemerin Bioactivity by Plasma Carboxypeptidase N, Carboxypeptidase B (Activated Thrombin-activable Fibrinolysis Inhibitor), and Platelets. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(2), 751–758. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805000200>
- Faurschou, M., & Borregaard, N. (2003). Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection*, *5*(14), 1317–1327. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2003.09.008>
- Fuchs, T. A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., & Zychlinsky, A. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *Journal of Cell Biology*, *176*(2), 231–241. <https://doi.org/10.1083/jcb.200606027>
- Garcia-Romo, G. S., Caielli, S., Vega, B., Connolly, J., Allantaz, F., Xu, Z., Punaro, M., Baisch, J., Guiducci, C., Coffman, R. L., Barrat, F. J., Banchereau, J., & Pascual, V. (2011). Netting Neutrophils Are Major Inducers of Type I IFN Production in Pediatric Systemic Lupus Erythematosus. *Science Translational Medicine*, *3*(73). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001201>
- Gilliet, M., & Lande, R. (2008). Antimicrobial peptides and self-DNA in autoimmune skin inflammation. In *Current Opinion in Immunology* (Vol. 20, Issue 4, pp. 401–407). <https://doi.org/10.1016/j.coi.2008.06.008>
- Guéry, L., & Hugues, S. (2015). New role for antigen-presenting activated pDCs in promoting Th17 cells and impacting antitumor immunity. *OncoImmunology*, *4*(5). <https://doi.org/10.4161/2162402X.2014.988476>
- Guttman-Yassky, E., Lowes, M. A., Fuentes-Duculan, J., Whynot, J., Novitskaya, I., Cardinale, I., Haider, A., Khatcherian, A., Carucci, J. A., Bergman, R., Bergman, R., & Krueger, J. G. (2007). Major differences in inflammatory dendritic cells and their products distinguish atopic dermatitis from psoriasis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *119*(5), 1210–1217. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.03.006>
- Guttman-Yassky, E., Nograles, K. E., & Krueger, J. G. (2011a). Contrasting pathogenesis of atopic dermatitis and psoriasis—Part I: Clinical and pathologic concepts. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *127*(5), 1110–1118. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.01.053>
- Guttman-Yassky, E., Nograles, K. E., & Krueger, J. G. (2011b). Contrasting pathogenesis of atopic dermatitis and psoriasis—Part II: Immune cell subsets and therapeutic concepts. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *127*(6), 1420–1432. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.01.054>

- Kulig, P., Zabel, B. A., Dubin, G., Allen, S. J., Ohyama, T., Potempa, J., Handel, T. M., Butcher, E. C., & Cichy, J. (2007). Staphylococcus aureus-derived staphopain B, a potent cysteine protease activator of plasma chemerin. *Journal of Immunology*, *178*(6), 3713–3720. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.6.3713>
- Lande, R., Gregorio, J., Facchinetti, V., Chatterjee, B., Wang, Y.-H., Homey, B., Cao, W., Wang, Y.-H., Su, B., Nestle, F. O., Zal, T., Mellman, I., Schröder, J.-M., Liu, Y.-J., & Gilliet, M. (2007). Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature*, *449*(7162), 564–569. <https://doi.org/10.1038/nature06116>
- Lin, A. M., Rubin, C. J., Khandpur, R., Wang, J. Y., Riblett, M., Yalavarthi, S., Villanueva, E. C., Shah, P., Kaplan, M. J., & Bruce, A. T. (2011). Mast Cells and Neutrophils Release IL-17 through Extracellular Trap Formation in Psoriasis. *The Journal of Immunology*, *187*(1), 490–500. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100123>
- Lundin, A., Fredens, K., Michaelsson, G., & Venge, P. (1990). The eosinophil granulocyte in psoriasis. *British Journal of Dermatology*, *122*(2), 181–193. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1990.tb08264.x>
- Majewski, P., Majchrzak-Gorecka, M., Grygier, B., Skrzeczynska-Moncznik, J., Osiecka, O., & Cichy, J. (2016). Inhibitors of Serine Proteases in Regulating the Production and Function of Neutrophil Extracellular Traps. *Frontiers in Immunology*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00261>
- Mathan, T. S. M., Figdor, C. G., & Buschow, S. I. (2013). Human plasmacytoid dendritic cells: From molecules to intercellular communication network. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 4, Issue NOV). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00372>
- McKenna, K. C., Beatty, K. M., Vicetti Miguel, R., & Bilonick, R. A. (2009). Delayed processing of blood increases the frequency of activated CD11b+ CD15+ granulocytes which inhibit T cell function. *Journal of Immunological Methods*, *341*(1–2), 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2008.10.019>
- Metzler, K. D., Goosmann, C., Lubojemska, A., Zychlinsky, A., & Papayannopoulos, V. (2014). A Myeloperoxidase-Containing Complex Regulates Neutrophil Elastase Release and Actin Dynamics during NETosis. *Cell Reports*, *8*(3), 883–896. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.044>
- Mitchell, T., Lo, A., Logan, M. R., Lacy, P., & Eitzen, G. (2008). Primary granule exocytosis in human neutrophils is regulated by Rac-dependent actin remodeling. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *295*(5), C1354–C1365. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00239.2008>
- Montaldo, E., Zotto, G. Del, Chiesa, M. Della, Mingari, M. C., Moretta, A., Maria, A. De, & Moretta, L. (2013). Human NK cell receptors/markers: A tool to analyze NK cell development, subsets and function. *Cytometry Part A*, *83A*(8), 702–713. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22302>
- Nagpal, S., Patel, S., Jacobe, H., DiSepio, D., Ghosn, C., Malhotra, M., Teng, M., Duvic, M., & Chandraratna, R. A. S. (1997). Tazarotene-induced gene 2 (TIG2), a novel retinoid-

- responsive gene in skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 109(1), 91–95.
<https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12276660>
- Nakajima, H., Loegering, D. A., Kita, H., Kephart, G. M., & Gleich, G. J. (1999). Reactivity of monoclonal antibodies EG1 and EG2 with eosinophils and their granule proteins. *Journal of Leukocyte Biology*, 66(3), 447–454. <https://doi.org/10.1002/jlb.66.3.447>
- Nestle, F. O., Conrad, C., Tun-Kyi, A., Homey, B., Gombert, M., Boyman, O., Burg, G., Liu, Y.-J., & Gilliet, M. (2005). Plasmacytoid dendritic cells initiate psoriasis through interferon- α production. *Journal of Experimental Medicine*, 202(1), 135–143.
<https://doi.org/10.1084/jem.20050500>
- Orsmond, A., Bereza-Malcolm, L., Lynch, T., March, L., & Xue, M. (2021). Skin Barrier Dysregulation in Psoriasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10841.
<https://doi.org/10.3390/ijms221910841>
- Ottaviani, C., Nasorri, F., Bedini, C., de Pità, O., Girolomoni, G., & Cavani, A. (2006). CD56brightCD16- NK cells accumulate in psoriatic skin in response to CXCL10 and CCL5 and exacerbate skin inflammation. *European Journal of Immunology*, 36(1), 118–128. <https://doi.org/10.1002/eji.200535243>
- Papayannopoulos, V., Metzler, K. D., Hakkim, A., & Zychlinsky, A. (2010). Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *Journal of Cell Biology*, 191(3), 677–691. <https://doi.org/10.1083/jcb.201006052>
- Parolini, S., Santoro, A., Marcenaro, E., Luini, W., Massardi, L., Facchetti, F., Communi, D., Parmentier, M., Majorana, A., Sironi, M., Tabellini, G., Moretta, A., & Sozzani, S. (2007). The role of chemerin in the colocalization of NK and dendritic cell subsets into inflamed tissues. *Blood*, 109(9), 3625–3632. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2006-08-038844>
- Pascual, V., Farkas, L., & Banchereau, J. (2006). Systemic lupus erythematosus: all roads lead to type I interferons. *Current Opinion in Immunology*, 18(6), 676–682.
<https://doi.org/10.1016/J.COI.2006.09.014>
- Remold-O'Donnell, E., Nixon, J. C., & Rose, R. M. (1989). Elastase inhibitor. Characterization of the human elastase inhibitor molecule associated with monocytes, macrophages, and neutrophils. *Journal of Experimental Medicine*, 169(3), 1071–1086.
<https://doi.org/10.1084/jem.169.3.1071>
- Rosales, C. (2020). Neutrophils at the crossroads of innate and adaptive immunity. In *Journal of Leukocyte Biology* (Vol. 108, Issue 1). <https://doi.org/10.1002/JLB.4MIR0220-574RR>
- Rothenfusser, S., Hornung, V., Ayyoub, M., Britsch, S., Towarowski, A., Krug, A., Sarris, A., Lubenow, N., Speiser, D., Endres, S., & Hartmann, G. (2004). CpG-A and CpG-B oligonucleotides differentially enhance human peptide-specific primary and memory CD8⁺ T-cell responses in vitro. *Blood*, 103(6), 2162–2169.
<https://doi.org/10.1182/BLOOD-2003-04-1091>
- Santana-de Anda, K., Gómez-Martín, D., Soto-Solís, R., & Alcocer-Varela, J. (2013). Plasmacytoid dendritic cells: Key players in viral infections and autoimmune diseases.

- Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 43(1), 131–136.
<https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2012.12.026>
- Sastre, B., Rodrigo-Muñoz, J., Garcia-Sanchez, D., Cañas, J., & del Pozo, V. (2018). Eosinophils: Old Players in a New Game. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 28(5), 289–304. <https://doi.org/10.18176/jiaci.0295>
- Scapini, P., Marini, O., Tecchio, C., & Cassatella, M. A. (2016). Human neutrophils in the saga of cellular heterogeneity: insights and open questions. *Immunological Reviews*, 273(1), 48–60. <https://doi.org/10.1111/imr.12448>
- Shao, S., Fang, H., Dang, E., Xue, K., Zhang, J., Li, B., Qiao, H., Cao, T., Zhuang, Y., Shen, S., Zhang, T., Qiao, P., Li, C., Gudjonsson, J. E., & Wang, G. (2019). Neutrophil Extracellular Traps Promote Inflammatory Responses in Psoriasis via Activating Epidermal TLR4/IL-36R Crosstalk. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00746>
- Takahashi, T., & Yamasaki, K. (2020). Psoriasis and Antimicrobial Peptides. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6791. <https://doi.org/10.3390/ijms21186791>
- Teague, H. L., Varghese, N. J., Tsoi, L. C., Dey, A. K., Garshick, M. S., Silverman, J. I., Baumer, Y., Harrington, C. L., Stempinski, E., Elnabawi, Y. A., Dagur, P. K., Cui, K., Tunc, I., Seifuddin, F., Joshi, A. A., Stansky, E., Purmalek, M. M., Rodante, J. A., Keel, A., Mehta, N. N. (2019). Neutrophil Subsets, Platelets, and Vascular Disease in Psoriasis. *JACC: Basic to Translational Science*, 4(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2018.10.008>
- Urban, C. F., Ermert, D., Schmid, M., Abu-Abed, U., Goosmann, C., Nacken, W., Brinkmann, V., Jungblut, P. R., & Zychlinsky, A. (2009). Neutrophil Extracellular Traps Contain Calprotectin, a Cytosolic Protein Complex Involved in Host Defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathogens*, 5(10), e1000639. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000639>
- Vanbervliet, B., Bendriss-Vermare, N., Massacrier, C., Homey, B., De Bouteiller, O., Brière, F., Trinchieri, G., & Caux, C. (2003). The inducible CXCR3 ligands control plasmacytoid dendritic cell responsiveness to the constitutive chemokine stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)/CXCL12. *Journal of Experimental Medicine*, 198(5), 823–830. <https://doi.org/10.1084/jem.20020437>
- Vermi, W., Lonardi, S., Morassi, M., Rossini, C., Tardanico, R., Venturini, M., Sala, R., Tincani, A., Poliani, P. L., Calzavara-Pinton, P. G., Cerroni, L., Santoro, A., & Facchetti, F. (2009). Cutaneous distribution of plasmacytoid dendritic cells in lupus erythematosus. Selective tropism at the site of epithelial apoptotic damage. *Immunobiology*, 214(9–10), 877–886. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2009.06.013>
- Vermi, W., Riboldi, E., Wittamer, V., Gentili, F., Luini, W., Marrelli, S., Vecchi, A., Franssen, J.-D., Communi, D., Massardi, L., Facchetti, F., & Sozzani, S. (2005). Role of ChemR23 in directing the migration of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to lymphoid organs and inflamed skin. *Journal of Experimental Medicine*, 201(4), 509–515. <https://doi.org/10.1084/jem.20041310>

- Villanueva, E., Yalavarthi, S., Berthier, C. C., Hodgins, J. B., Khandpur, R., Lin, A. M., Rubin, C. J., Zhao, W., Olsen, S. H., Klinker, M., Shealy, D., Denny, M. F., Plumas, J., Chaperot, L., Kretzler, M., Bruce, A. T., & Kaplan, M. J. (2011). Netting Neutrophils Induce Endothelial Damage, Infiltrate Tissues, and Expose Immunostimulatory Molecules in Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Immunology*, *187*(1), 538–552. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100450>
- Wang, Y., Li, M., Stadler, S., Correll, S., Li, P., Wang, D., Hayama, R., Leonelli, L., Han, H., Grigoryev, S. A., Allis, C. D., & Coonrod, S. A. (2009). Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *Journal of Cell Biology*, *184*(2), 205–213. <https://doi.org/10.1083/jcb.200806072>
- Wittamer, V., Bondue, B., Guillabert, A., Vassart, G., Parmentier, M., & Communi, D. (2005). Neutrophil-Mediated Maturation of Chemerin: A Link between Innate and Adaptive Immunity 1. In *The Journal of Immunology* (Vol. 175).
- Wittamer, V., Franssen, J. D., Vulcano, M., Mirjolet, J. F., Le Poul, E., Migeotte, I., Brézillon, S., Tyldesley, R., Blanpain, C., Detheux, M., Mantovani, A., Sozzani, S., Vassart, G., Parmentier, M., & Communi, D. (2003). Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. *Journal of Experimental Medicine*, *198*(7), 977–985. <https://doi.org/10.1084/jem.20030382>
- Wollenberg, A., Wagner, M., Günther, S., Towarowski, A., Tuma, E., Moderer, M., Rothenfusser, S., Wetzel, S., Endres, S., & Hartmann, G. (2002). Plasmacytoid dendritic cells: A new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases. *Journal of Investigative Dermatology*, *119*(5), 1096–1102. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2002.19515.x>
- Zabel, B. A., Allen, S. J., Kulig, P., Allen, J. A., Cichy, J., Handel, T. M., & Butcher, E. C. (2005). Chemerin Activation by Serine Proteases of the Coagulation, Fibrinolytic, and Inflammatory Cascades. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(41), 34661–34666. <https://doi.org/10.1074/JBC.M504868200>
- Zabel, B. A., Silverio, A. M., & Butcher, E. C. (2005). Chemokine-like receptor 1 expression and chemerin-directed chemotaxis distinguish plasmacytoid from myeloid dendritic cells in human blood. *Journal of Immunology*, *174*(1), 244–251. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.1.244>
- Zabieglo, K., Majewski, P., Majchrzak-Gorecka, M., Włodarczyk, A., Grygier, B., Zegar, A., Kapinska-Mrowiecka, M., Naskalska, A., Pyrc, K., Dubin, A., Wahl, S. M., & Cichy, J. (2015). The inhibitory effect of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) on formation of neutrophil extracellular traps. *Journal of Leukocyte Biology*, *98*(1), 99–106. <https://doi.org/10.1189/jlb.4AB1114-543R>

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

W roku 2014 zainteresowania zespołu, w którym pracowałam zaowocowały zaproszeniem do projektu w ramach akcji COST Action BM1404 Mye-EUNITER, zrzeszającej naukowców z 25 krajów europejskich badających mieloidalne komórki regulatorowe (MRC). W ramach tej akcji powstała grupa badaczy i klinicystów, której nadrzędnym celem było ustanowienie wspólnego standardowego protokołu pozwalającego na izolację w/w komórek i przedstawienie wytycznych dotyczących analizy i monitorowania poziomu MRC u pacjentów. Komórki MRC mogą pokazywać markery typowe dla monocytów, są to Mo-MDSC lub neutrofile i są to PMN-MDSC, które to populacje pojawiają się w przebiegu chorób nowotworowych, zapalnych i autoimmunizacyjnych, a ich monitorowanie mogłoby dostarczać informacji o postępie choroby. Pomimo znaczenia MRC dla patofizjologii wielu chorób ich biologia nie była dobrze poznana. Rosnąca liczba prac doświadczalnych wskazujących na obecność MRC w różnych jednostkach chorobowych, przy dużej ich heterogenności z jednej strony, a przy braku znormalizowanych procedur z drugiej strony przyczyniała się do dużego chaosu w nomenklaturze dotyczącej tych komórek czy ich charakterystyce, prowadząc często do publikacji sprzecznych wyników. W czasie kolejnych spotkań i warsztatów w latach 2016-2018 (Mye-MMI Traingschool part I “MDSC Monitoring Initiative” within COST Action BM1404 Mye-EUNITER; Mye-MMI Traingschool part II “Functional suppression assay” within COST Action BM1404 Mye-EUNITER), w których brałam udział został zaproponowany i ustalony protokół izolacji, fenotypowania i oceny funkcji MRC. Następnie zostałam zaproszona do udziału w części praktycznej powyższego przedsięwzięcia, kiedy w centralnym laboratorium w Essen (Niemcy) testowaliśmy i optymalizowaliśmy zaproponowany protokół. W kolejnym kroku przygotowany protokół był wykorzystywany niezależnie przez 13 grup badawczych, zajmujących się badaniem MRC w przebiegu różnych schorzeń. Moim zadaniem była izolacja komórek z krwi obwodowej pochodzącej od pacjentów z łuszczycą i zdrowych dawców stanowiących grupę kontrolną oraz analiza fenotypowa i/lub funkcjonalna MRC. Uzyskane wyniki zostały przedstawione w publikacji:

Cassetta L, Bruderek K, **Skrzeczynska-Moncznik J**, Osiecka O, Hu X, Rundgren IM, Lin A, Santegoets K, Horzum U, Godinho-Santos A, Zelinsky G, Garcia-Tellez T, Bjelica S, Taciak B, Kittang AO, Höing B, Lang S, Dixon M, Müller V, Utikal JS, Karakoç D, Yilmaz

KB, Górka E, Bodnar L, Anastasiou OE, Bourgeois C, Badura R, Kapinska-Mrowiecka M, Gotic M, Ter Laan M, Kers-Rebel E, Król M, Santibañez JF, Müller-Trutwin M, Dittmer U, de Sousa AE, Esendağlı G, Adema G, Loré K, Ersvær E, Umansky V, Pollard JW, Cichy J, Brandau S; **2020**. Differential expansion of circulating human MDSC subsets in patients with cancer, infection and inflammation. *Journal for Immunotherapy of Cancer*. 8 (2): e001223. doi: 10.1136/jitc-2020-001223

i wskazują na znaczenie wielu aspektów technicznych (rodzaj wykorzystywanego antykoagulanta, podłoża do izolacji komórek) dla końcowego wyniku opisującego udział odsetkowy populacji MRC wśród leukocytów krążących. Wyniki uzyskane w oparciu o te same protokoły, analizujące materiał od pacjentów z chorobami nowotworowymi, infekcyjnymi i zapalnymi (w tym łuszczycy) pozwolił na szeroką, porównawczą analizę MRC w tych jednostkach chorobowych. Zastosowanie znormalizowanych procedur pokazało dominującą ekspansję PMN-MDSC w guzach litych, która była wyraźnie podniesiona w odniesieniu do wzrostu obserwowanego w przewlekłych infekcjach i stanach zapalnych, w tym łuszczycy. Wspólna realizacja badań dostarczyła ujednolicony protokół rekomendowany do wykorzystania przez inne grupy zainteresowane badaniem MRC oraz zwróciła uwagę na kilka aspektów technicznych istotnych dla dalszych badań populacji MRC.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

Działalność dydaktyczna: Podczas mojej pracy w Zakładzie Immunologii WBBiB UJ byłam znacząco zaangażowana w działalność dydaktyczną. Na przestrzeni lat: 2002-2023 prowadziłam i/lub koordynowałam zajęcia praktyczne z immunologii dedykowane studentom Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, kierunków Biotechnologia, Biochemia, Biofizyka Molekularna i Komórkowa oraz Bioinformatyka. W latach 2014-2015 pełniłam funkcje opiekuna naukowego Studenckiego Projektu Badawczego pod tytułem: Porównanie skrawków skóry zdrowej i łuszczycowej w kontekście występujących populacji komórek ze szczególnym uwzględnieniem plazmacytoidalnych komórek dendrytycznych (pDC) i obecności granzymu B z wykorzystaniem metod immunohistochemicznych i mikroskopii fluorescencyjnej, realizowanego przez zespół studentów. Obowiązki dydaktyczne realizowałam także jako promotor prac licencjackich

(13 prac dyplomowych) oraz magisterskich (14 prac dyplomowych) studentów kierunku Biotechnologia molekularna i Biochemia na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii. Ponadto byłam recenzentem 4 dyplomowych prac licencjackich i 5 dyplomowych prac magisterskich. W ostatnich latach pełniłam funkcje promotora pomocniczego w przewodzie doktorskim, w którym praca została złożona i otrzymała dwie pozytywne recenzje oraz jestem promotorem pomocniczym dwójki doktorantów, będących słuchaczami Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych UJ, którzy nie otwarli jeszcze przewodów doktorskich. Dbając o jakość kształcenia kilkakrotnie przygotowywałam projekty wskazujące zmiany w programie zajęć i starałam się o uzyskanie finansowania, na poprawę jakości oferowanych zajęć praktycznych, ze źródeł wewnętrznych UJ. Swoje kompetencje dydaktyczne podnosiłam uczestnicząc w szkoleniach: Coaching jako metoda podniesienia kompetencji dydaktycznych (3 dniowe warsztaty, kwiecień 2021) oraz Rozwój umiejętności trenerskich kadry dydaktyczno-naukowej (4 dniowe warsztaty, wrzesień 2021).

Działalność organizacyjna: Od listopada 2022 roku pełnię funkcję koordynatora pomocy studentom z Ukrainy. Moim zadaniem jest badanie potrzeb edukacyjnych i socjalnobytowych studentów z Ukrainy oraz działania pozwalające na realizację w/w.

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

Efektom mojej pozostałej działalności naukowej, na którą chcę zwrócić uwagę jest 14 prac oryginalnych oraz 2 prace przeglądowe, opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora, których jestem współautorem. Podczas kariery zawodowej wspomagałam swój rozwój naukowy poprzez udział w krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych. Na podkreślenie zasługuje mój aktywny udział w w/w spotkaniach, gdzie wielokrotnie miałam okazję prezentować wyniki realizowanych przeze mnie badań, a czterokrotnie otrzymałam możliwość wygłoszenia krótkich prezentacji ustnych swoich wyników, co świadczy o dużym znaczeniu podejmowanych przez mnie tematów w środowisku naukowym.

Byłam autorem projektu naukowego, który uzyskał finansowanie z Narodowego Centrum Nauki, gdzie pełniłam funkcje kierownika projektu. Ponadto w latach 2015-2018 kierowałam projektem naukowym finansowanym ze źródeł własnych WBBiB UJ w ramach funduszy KNOW.

Moja ekspertyza w zakresie biologii komórek mieloidalnych i warsztat naukowy związany ze znajomością metody cytometrii przepływowej i jej zastosowań, były istotne dla udziału w projektach naukowych, prowadzonych przez inne osoby. W nawiązaniu do wykazu osiągnięć naukowych byłam zaangażowana w realizację 6 projektów finansowanych ze źródeł zewnętrznych – Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego i NCN, w których byłam głównym wykonawcą (dwa projekty) lub wykonawcą (cztery projekty).

Mówiąc o karierze naukowej warto zaznaczyć, że kilkakrotnie zostałam zaproszona do sporządzenia recenzji oryginalnych artykułów naukowych dla wysoko punktowanych czasopism zagranicznych, co było dla mnie osobistym wyróżnieniem.

.....

(podpis wnioskodawcy)