

Dr Daria Augustyniak

Autoreferat

Zakład Biologii Patogenów i Immunologii

Wydział Nauk Biologicznych



Wrocław 2018

Spis treści

1. Imię i nazwisko:	2
2. Posiadane dyplomy	2
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....	2
4. Opis merytoryczny osiągnięcia naukowego przedstawionego do oceny.....	2
4.1. Charakterystyka bakterii wykorzystanych w badaniach i uzasadnienie tematu badań.....	5
4.2. Rola przeciwciał krzyżowo-reagujących w obronie wobec <i>M. catarrhalis</i>	6
4.2.1. Czynniki wirulencji i zależna od przeciwciał obrona immunologiczna	6
4.2.2. Immunogenność i reaktywność krzyżowa antygenów <i>M. catarrhalis</i>	7
4.2.3. Działanie protekcyjne przeciwciał krzyżowo-reagujących	11
4.2.4. Identyfikacja oraz analiza immunoproteomiczna i bioinformatyczna białek bakteryjnych rozpoznawanych przez przeciwciała krzyżowo-reagujące	13
4.3. Rola neuropeptydów w obronie wobec <i>Moraxella catarrhalis</i>	16
4.3.1. Działanie bakteriobójcze i immunomodulujące	16
4.3.2. Działanie przeciwzapalne	18
5. Plany na przyszłość.....	23
6. Omówienie wybranych pozostałych osiągnięć naukowych	23
6.1. Przed uzyskaniem stopnia doktora	23
6.2. Po uzyskaniu stopnia doktora	24
6.2.1. Badania dotyczące działania związków przeciwnowotworowych i przeciwmikrobowych	25
6.2.2. Badania dotyczące biologii patogenów, w tym bakteriofagów litycznych oraz bakterii gram-ujemnych	28
6.2.3. Badania nad rolą humoralnych biomarkerów w stanach patologicznych i fizjologicznych	31
6.2.4. Badania dotyczące zależności pomiędzy morfologicznymi i hormonalnymi miernikami kondycji biologicznej człowieka a funkcjonowaniem układu immunologicznego	33
7. Piśmiennictwo	35

1. Imię i nazwisko: Daria Augustyniak

2. Posiadane dyplomy

- magister biologii - 1992 - Wydział Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Wrocławskiego; tytuł pracy *„Wpływ długotrwałej kortykoterapii na bakteriobójczą aktywność surowicy krwi u chorych na astmę oskrzelową”* promotor: prof. dr hab. Adam Jankowski, recenzent: prof. dr hab. Tadeusz Lachowicz
- doktor nauk biologicznych w zakresie biologii - 2000 - Instytut Mikrobiologii, Wydział Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Wrocławskiego; tytuł pracy: *„Immunogenność wybranych antygenów Branhamella catarrhalis oraz ich udział w alergizacji ustroju u dzieci z nawracającymi zakażeniami dróg oddechowych i z astmą oskrzelową”* promotor: prof. dr hab. Adam Jankowski, recenzenci: doc. dr hab. Maria Kraus-Filarska, prof. dr hab. Czesław Ługowski

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- 01.10.1993 – asystent w Zakładzie Mikrobiologii Instytutu Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego
- 01.12.1995 – 30.11.1999 – studia doktoranckie na Wydziale Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Wrocławskiego
- od 14.02.2002 do chwili obecnej adiunkt, najpierw w Pracowni Immunologii Zakładu Mikrobiologii, a od 2010 w nowopowstałym Zakładzie Biologii Patogenów i Immunologii Instytutu Genetyki i Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego

Staże zagraniczne

- USA – University of Minnesota Duluth, 2008 (3 miesiące)
- Francja – INSERM U1047, UFR Médecine, Université Montpellier, 2014 (3 miesiące)

4. Opis merytoryczny osiągnięcia naukowego przedstawionego do oceny

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. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.)

(A) Tytuł osiągnięcia naukowego

Rola przeciwciał krzyżowo-reagujących oraz neuropeptydów w obronie gospodarza przed bakteriami *Moraxella catarrhalis*

(B) Wykaz prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Osiągnięcie naukowe zostało udokumentowane w cyklu powiązanych tematycznie pięciu prac oryginalnych i dwóch przeglądowych opublikowanych w latach 2010-2018. Kopie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia zostały zawarte w Załączniku nr 4, natomiast oświadczenia habilitantki i współautorów publikacji stanowią Załącznik nr 5.

Publikacje oryginalne:

P1. Augustyniak D[✉], Mleczko J, Gutowicz J. The immunogenicity of the liposome-associated outer membrane proteins (OMPs) of *Moraxella catarrhalis*. Cellular and Molecular Biology Letters 2010, 15 (1): 70-89

[IF₂₀₁₀: **1,455** MNiSW₂₀₁₀: **15**; udział własny: **80%**]

P2. Augustyniak D[✉], Piekut M, Majkowska-Skrobek G, Skała J. Bactericidal, opsonophagocytic and anti-adhesive effectiveness of cross-reactive antibodies against *Moraxella catarrhalis*. Pathogens and Disease 2015, 73 (3): ftu026

[IF₂₀₁₅: **2,483**; MNiSW₂₀₁₃₋₂₀₁₆: **25**; udział własny: **80%**]

P3. Augustyniak D[✉], Seredyński R, McClean S, Roszkowiak J, Roszniowski B, Smith DL, Drulis-Kawa Z, Mackiewicz P[✉]. Virulence factors of *Moraxella catarrhalis* outer membrane vesicles are major targets for cross-reactive antibodies and have adapted during evolution. Scientific Reports, 8 (1): 4955

[IF₂₀₁₇: **4,122**; MNiSW₂₀₁₃₋₂₀₁₆: **40**; udział własny: **45%**]

P4. Augustyniak D[✉], Jankowski A, Mackiewicz P, Skowrya A, Gutowicz J, Drulis-Kawa Z. Innate immune properties of selected human neuropeptides against *Moraxella catarrhalis* and nontypeable *Haemophilus influenzae*. BMC Immunology 2012, 2: 13-24

[IF₂₀₁₂: **2,610**; MNiSW₂₀₁₂: **25**; udział własny: **75%**]

P5. Augustyniak D[✉], Roszkowiak J, Wiśniewska I, Skała J, Gorczyca D, Drulis-Kawa Z. Neuropeptides SP and CGRP diminish the *Moraxella catarrhalis* outer membrane vesicle (OMV)-

triggered inflammatory response of human A549 epithelial cells and neutrophils. *Mediators of Inflammation* 2018, 2018: 4847205

[IF₂₀₁₇: **3,549**; MNiSW₂₀₁₃₋₂₀₁₆: **30**; udział własny: **80%**]

Publikacje przeglądowe:

P6. **Augustyniak D[✉]**, Majkowska-Skrobek G, Roszkowiak J, Dorotkiewicz-Jach A. Defensive and offensive cross-reactive antibodies elicited by pathogens: the Good, the Bad and the Ugly. *Current Medicinal Chemistry* 2017, 24 (36): 4002-4037

[IF₂₀₁₇: **3,469**; MNiSW₂₀₁₃₋₂₀₁₆: **40**; udział własny: **70%**]

P7. **Augustyniak D[✉]**, Nowak J, Lundy FT. Direct and indirect antimicrobial activities of neuropeptides and their therapeutic potential. *Current Protein & Peptide Science* 2012, 13 (8): 723-738

[IF₂₀₁₂: **2,326**; MNiSW₂₀₁₂: **30**; udział własny: **85%**]

✉ - autor korespondencyjny

Sumaryczny *impact factor* - IF publikacji zgodnie z rokiem opublikowania: **20,014**

Suma punktów za publikacje zgodnie z podanym wykazem MNiSW: **205**

Liczba cytowań publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wg bazy Web of Science Core Collection wynosi **55** (bez autocytowań 42)

(C) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Przedstawione powyżej zestawienie zawiera publikacje z dwóch głównych wątków tematycznych, analizowanych na tle oddziaływań *Moraxella catarrhalis*-gospodarz i są to:

1. Prace dotyczące obronnej roli przeciwciał krzyżowo-reagujących wobec *M. catarrhalis*
[publikacje P1, P2, P3, P6]
2. Prace dotyczące obronnej roli neuropeptydów wobec *M. catarrhalis*
[publikacje P4, P5, P7]

Publikacje będące podstawą postępowania habilitacyjnego są w tekście cytowane jako **P1 – P7**, inne publikacje współautorskie habilitantki pogrubioną czcionką italic, natomiast pozostałe publikacje – zwykłą czcionką.

4.1. Charakterystyka bakterii wykorzystanych w badaniach i uzasadnienie tematu badań

Bakterie *Moraxella catarrhalis* to gram-ujemne tlenowe dwójki, które zakażają wyłącznie człowieka [Su i wsp., 2012]. Przez dwie ostatnie dekady postrzeganie ich zasadniczo się zmieniło - od nieszkodliwego komensala zasiedlającego jamę nosowo-gardłową, do patogenu ulegającego łatwej transmisji w populacji. Obecnie zakażenia wywoływane przez *M. catarrhalis* uważa się za istotny problemem zdrowia publicznego, zarówno z przyczyn klinicznych jak i ekonomicznych [Masaki i wsp., 2011]. U dzieci bakterie te odpowiadają za ostre zapalenia ucha środkowego [Broides i wsp., 2009], u dorosłych natomiast za ciężkie zaostrzenia w przebiegu przewlekłej obturacyjnej choroby płuc (POCHP) [Murphy i wsp., 2005]. Narasta też znaczenie *M. catarrhalis* w rozwoju astmy oskrzelowej [Bisgaard i wsp., 2007, Larsen i wsp., 2014].

W patogenezie schorzeń powodowanych przez *M. catarrhalis*, kluczową rolę pełni kolonizacja układu oddechowego przez nowe szczepy [Parameswaran i wsp., 2011]. Rezerwuarem bakterii jest także tkanka nabłonkowa czy limfatyczna [Heiniger i wsp., 2007, Slewogt i wsp., 2007]. Istnieją doniesienia, że za wzmożoną kolonizację z udziałem *M. catarrhalis* może odpowiadać powszechne stosowanie szczepień przeciwko *Streptococcus pneumoniae* czy *Haemophilus influenzae*, poprzez zaburzenia jakościowego oraz ilościowego składu nosogardła [Murphy i Parameswaran 2009]. Zgodnie z hipotezą „vaccine-induced pathogen strain replacement” [Martcheva i wsp., 2008], *M. catarrhalis* zaczyna zatem odgrywać bardziej prominentną rolę w hierarchii czynników infekcyjnych układu oddechowego, również poprzez fakt stawiania się niejako zmiennikiem dotychczas dominujących patogenów.

Dodatkowo, *M. catarrhalis* ułatwia zasiedlanie nisz układu oddechowego przedstawicielom innych gatunków bakterii, przyczyniając się znacząco do wzrostu ich wirulencji. Na przykład poprzez produkcję β-laktamaz [Schmitz i wsp., 2002], zapewnia pasywną protekcję *S. pneumoniae* czy *H. influenzae* przed działaniem antybiotyków β-laktamowych [Schaar² i wsp., 2011, Perez i wsp., 2014]. Przyczynia się też do wzrostu ekspresji genów kodujących czynniki wirulencji u *Streptococcus pyogenes* [Verhaegh i wsp., 2013]. Można zatem przypuszczać że w infekcjach polimikrobowych *M. catarrhalis* „steruje” wirulencją innych bakterii.

Powyższe doniesienia oraz fakt, że na świecie wciąż nie ma dostępnej szczepionki przeciwko *M. catarrhalis* [Ren i Pichichero 2016, Perez i Murphy 2017] wskazują na rosnącą rolę tej bakterii w patogenezie chorób układu oddechowego. W tym świetle poznanie nowych czynników humoralnych w relacji patogen-gospodarz z jej udziałem wraz z charakterystyką ich potencjału obronnego nabiera istotnego znaczenia. Podstawą osiągnięcia naukowego, stanowiącego podstawę do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego, są zatem prace, w których scharakteryzowano interakcje pomiędzy przeciwciałami krzyżowo-reagującymi oraz

neuropeptydami a *M. catarrhalis*, a także modulujący wpływ tych humoralnych elementów na wybrane aspekty nieswoistej odpowiedzi immunologicznej wobec *M. catarrhalis*.

4.2. Rola przeciwciał krzyżowo-reagujących w obronie wobec *M. catarrhalis*

4.2.1. Czynniki wirulencji i zależna od przeciwciał obrona immunologiczna

Z racji budowy swych osłon, kluczowymi czynnikami wirulencji *M. catarrhalis* są białka błony zewnętrznej (OMPs). Dzieląc je funkcjonalnie zaliczamy do nich: (1) białka UspA1, UspA2, OMP CD czy OMP E, zaangażowane w blokowanie efektywnej odpowiedzi ze strony dopełniacza, poprzez wiązanie regulatorów kaskady, czy blokowanie tworzenia kompleksu atakującego błonę [Holm i wsp., 2004, Nordstrom i wsp., 2005, Attia i wsp., 2006, Hallstrom i wsp., 2011], (2) liczne adhezyny np. OMP CD, Hag/MID, UspA1, UspA2, McaP ułatwiające adhezję i inwazyjność, a w przypadku UspA1, UspA2H i Hag/MID również tworzenie biofilmu [Lafontaine i wsp., 2000, Timpe i wsp., 2003, Holm i wsp., 2004, Pearson i wsp., 2006], (3) białka neutralizujące inhibitory proteaz jak UspA1 i UspA2, co prowadzi do zaburzenia równowagi proteazowo-antyproteazowej i w efekcie do uszkodzenia tkanek [Manolov i wsp., 2008, Parameswaran i wsp., 2009] czy (4) białko Hag/MID uczestniczące w poliklonalnej „niespecyficznej” aktywacji limfocytów B, poprzez interakcję z powierzchniowymi immunoglobulinami IgD [Nordström i wsp., 2006, Vidakovics i wsp., 2010].

Z uwagi na przynależność *M. catarrhalis* do patogenów bytujących zasadniczo w środowisku pozakomórkowym, kluczowe ramie swoistej odpowiedzi immunologicznej wobec niej bazuje na produkowanych przez limfocyty B przeciwciałach. Powstają one przeciwko antygenom: (a) o silnej immunogenności, (b) posiadającym determinanty antygenowe wyeksponowane na powierzchni patogenu, (c) cechującym się konserwatywnością antygenową w obrębie danego gatunku oraz (d) ulegającym ekspresji w miejscu patogenez [Ren i Pichichero 2016, Perez i Murphy 2017]. Unikatowość przeciwciał rozpatrywana na poziomie populacyjnym organizmu polega na zdolności do rozpoznawania niewyobrażalnie dużej liczby epitopów, różnorodnych pod względem biochemicznym. Unikatowość rozpatrywana na poziomie komórkowym dotyczy, bazującego na hipermutacjach, zjawiska dojrzewania powinowactwa (*affinity maturation*), czyli sukcesywnego zwiększania powinowactwa bez zmiany specyficzności w trakcie generowania odpowiedzi immunologicznej. Innymi słowy przeciwciała to wysoce specyficzne receptory o dystrybucji klonalnej, które w ujęciu poliklonalnym cechują się znaczną dywersyfikacją tych specyficzności [publikacja P6].

Zależna od przeciwciał przeciwbakteryjna obrona organizmu bazuje zasadniczo na mechanizmach typu: (i) aglutynacja, (ii) neutralizacja, (iii) blokowanie adhezji, (iv) aktywacja dopełniacza, (v) wzmacnianie fagocytozy czy (vi) wzmacnianie cytotoksyczności komórek gospodarza

[publikacja P6]. To szerokie spektrum funkcji efektorowych gwarantuje populacji immunoglobulin maksymalne dopasowanie do potrzeb rozpoznania i eliminacji patogenów. Pewną grupę przeciwciał może cechować zdolność do tzw. protekcyjnej reaktywności krzyżowej czyli do uruchomienia mechanizmów obronnych po rozpoznaniu antygenów, które nie indukowały ich powstania. W grupie tej znajdują się zarówno: (1) naturalne przeciwciała polireaktywne klasy IgM, obdarzone niskim powinowactwem i zdolne do rozpoznawania strukturalnie odmiennych antygenów (białka, cukry, DNA) bez uprzedniej stymulacji antygenowej jak i (2) przeciwciała krzyżowo-reagujące klas IgG, IgA czy IgE, o znacznym powinowactwie, zdolne do rozpoznawania strukturalnie podobnych determinant antygenowych i powstające wyłącznie w następstwie stymulacji antygenowej [Trinh i wsp., 1997, Zhou i wsp., 2007, Gunti i wsp., 2015; **publikacja P6**]. W grupie tych drugich głównie są te, które mogą wspomagać ochronę gospodarza przed bakteriami tego samego gatunku, innych gatunków ale też te, których ochrona przekracza granice poszczególnych królestw mikroorganizmów **[publikacja P6]**.

W ujęciu ewolucyjnym, za nabywaniem większej reaktywności krzyżowej przeciwciał przemawia fakt, że znacząco poszerza ona ich repertuar przeciwmikrobowy. Większa specyficzność z kolei jest kluczowa z punktu widzenia precyzji rozpoznania, niwelując równocześnie ryzyko autoagresji [Borghans i wsp., 1999, Fairlie-Clarke i wsp., 2009]. Dwoistość natury przeciwciał krzyżowych balansuje zatem pomiędzy ich korzystną rolą obronną, a negatywnymi konsekwencjami dotyczącymi udziału w zaostrzaniu istniejącej choroby infekcyjnej, alergicznej czy w autoimmunologicznej ofensywie na własne tkanki. Charakterystykę korzystnych i szkodliwych efektów, wynikających z działań przeciwciał krzyżowo-reagujących, których powstanie było indukowane patogenami, zawarłam w pracy przeglądowej z 2017 **[publikacja P6]**.

Celem niniejszego postępowania habilitacyjnego, w części dotyczącej roli przeciwciał krzyżowo-reagujących w ochronie przed *M. catarrhalis* jest charakterystyka ich interakcji z antygenami bakterii oraz korzyści wynikających z tych anty-wirulentnych działań dla gospodarza poprzez szeroko pojętą aktywację sił obronnych.

4.2.2. Immunogenność i reaktywność krzyżowa antygenów *M. catarrhalis*

Tematykę dotyczącą immunogenności *M. catarrhalis* rozpoczęłam jeszcze w trakcie realizacji pracy doktorskiej (pkt. 6.1 autoreferatu). Wobec faktu, że dostępność antygenów o właściwościach immunogennych dla układu immunologicznego jest zawsze warunkiem *sine qua non* jego efektywnej aktywacji, zdefiniowanie immunogenności stanowiło punkt wyjścia moich badań. Już wówczas zidentyfikowanych było kilka immunogennych białek błony zewnętrznej (OMPs) tej bakterii tj. UspA1, UspA2, Hag/MID, CopB, OMP CD, czy OMP E [Ren i Pichichero 2016]. Jednakże dane dotyczące uodpornienia organizmu na *M. catarrhalis* były wciąż niejednoznaczne. Donoszono

na przykład, że immunizacja oparta na wybiórczych białkach OMPs jak choćby UspA1, UspA2 czy Hag/MID, występujących w odmiennych wariantach antygenowych, może być niewystarczająca dla zapewnienia efektywnej ochrony dzieci czy dorosłych [Verhaegh i wsp., 2008, Brooks i wsp., 2008, Verhaegh i wsp., 2012]. Potwierdzały to badania kliniczne, wedle których u dzieci chorujących na nawrotowe ostre lub przewlekłe wysiękowe zapalenie ucha środkowego wywołane *M. catarrhalis*, nie odnotowywano negatywnej korelacji pomiędzy systemowym czy lokalnym stężeniem IgG anty-*M. catarrhalis* wobec wiodących immunogenów, a stopniem kolonizacji układu oddechowego. Taką korelację wykazywano z kolei w odniesieniu do mniej spektakularnych antygenów [Ren i wsp., 2015]. Dodawano do tego niezmiernie ważną, z punktu widzenia patogenezy, rolę nowych szczepów *M. catarrhalis* w kolonizacji układu oddechowego [Parameswaran i wsp., 2011].

W świetle tych badań finalne uodpornienie organizmu wobec *M. catarrhalis* wydawało się być raczej pochodną częstotliwości oraz czasu trwania kolonizacji, aniżeli konsekwencją lokalnego ostrego zakażenia *per se*. Nasuwało się wobec tego przypuszczenie, że istniejąca pula swoistych przeciwciał danego organizmu, obejmująca również przeciwciała krzyżowo-reagujące, może być ważną współzmienną wpływającą na końcowy rezultat uodpornienia. Moim nadrzędnym celem były zatem badania nad efektywnością działania przeciwciał krzyżowych, nie wobec konkretnego antygeny, lecz wobec zbioru powierzchniowych immunogenów *M. catarrhalis*, z którymi organizm może zetknąć się w trakcie naturalnej immunizacji lub w następstwie potencjalnego szczepienia. Dokonując wyboru antygenów do immunizacji, na wstępie przeprowadziłam screening fenotypowy kilkunastu klinicznych szczepów *M. catarrhalis* pochodzących z kolekcji własnej, pozyskanych dzięki współpracy z laboratorium bakteriologicznym szpitala im. Korczaka we Wrocławiu (obecnie szpital im. Gromkowskiego). Na jego podstawie dokonałam selekcji i w zasadniczych badaniach wykorzystałam cztery fenotypowo-różne szczepy, oznaczone jako Mc1, Mc5, Mc6 i Mc8. Szczepy te różniły się zdolnością do tworzenia biofilmu (Mc6 > Mc1 > Mc5 > Mc8) oraz właściwościami adhezyjnymi do komórek linii nabłonka raka płuc A549 (Mc1 > Mc5 = Mc6 > Mc8). Nie różniły się natomiast wrażliwością na surowicę świnki morskiej, co na dalszym etapie badań umożliwiło ocenę roli przeciwciał krzyżowo-reagujących w aktywacji kaskady komplementu. Charakterystykę fenotypową wszystkich szczepów wykonałam osobiście **[publikacja P2]**.

Do badań wykorzystałam myszy Balb/c. Zwierzęta te jako organizm modelowy są bardzo wdzięczne do generowania przeciwciał poszczepiennych w odpowiedzi na immunizację *M. catarrhalis*, gdyż nie są naturalnie zakażane tą bakterią. Oznacza to, że wszystkie powstające w ich organizmie przeciwciała IgG swoiste wobec *M. catarrhalis*, stanowią w całości pulę przeciwciał wyprodukowanych *de novo*, co udowodniłam eksperymentalnie **[publikacja P1, publikacja P2, publikacja P3]**. Do immunizacji myszy Balb/c użyłam dwa zestawy antygenowe, pochodzące z każdego z czterech wymienionych szczepów. Były to zarówno całe zabite komórki bakteryjne

(zestaw pierwszy) jak i białka błony zewnętrznej OMPs izolowane z wykorzystaniem łagodnego niejonowego detergentu Zwittergent 3.14 (zestaw drugi). Wybór podanych zestawów w pełni odzwierciedlał wykorzystanie wielowartościowych pod względem antygenowym, po pierwsze komórek bakteryjnych, zdolnych do indukcji najbliższej rzeczywistej, odpowiedzi ze strony gospodarza, po drugie mieszaniny białek OMPs zaliczanych do najsilniejszych immunogennych struktur tej bakterii. Dzięki detergentowi o stosunkowo wysokim krytycznym stężeniu micelarnym udało nam się zachować silne właściwości immunogenne białek OMPs w uzyskanych proteomicellach (OMPs-Z). W następstwie immunizacji uzyskałam osiem odrębnych pul anty-surowic, z których każda złożona była z 5-7 surowic indywidualnych. Pule te nazwałam: anty-Mc1, anty-Mc5, anty-Mc6, anty-Mc8 (immunizacja myszy całymi bakteriami) oraz anty-OMPMc1, anty-OMPMc5, anty-OMPMc6, anty-OMPMc8 (immunizacja myszy OMPs) **[publikacja P1, publikacja P2]**. Do części szczepień wykorzystałam także formułacje antygenowe złożone z OMPs zasocjowanych z liposomami **[publikacja P1]**.

Pytania, które sobie wówczas postawiliśmy brzmiały: (1) czy a jeśli tak to które immunogenne białka OMPs są efektywnie inkorporowane w pęcherzyki liposomowe zbudowane z neutralnej L- α -fosfatydylocholiny (PC) tworząc proteoliposomy, (2) czy istnieje różnica pomiędzy immunogennością białek OMPs w zależności od sposobu ich asocjacji z liposomami, (3) które z białek OMPs będą najsilniej rozpoznawane przez mysie oraz ludzkie przeciwciała krzyżowo-reagujące **[publikacja P1]**. Bazując na danych literaturowych o wbudowywaniu białek w dwuwarstwę lipidową, które odbywa się albo drogą insercji białka w już utworzone pęcherzyki lipidowe lub drogą inkorporacji w dwuwarstwę na etapie formowania pęcherzyka [Rigaud i wsp., 2003], w swoich badaniach zastosowaliśmy obie te procedury. Dodając białka OMPs do już utworzonych pęcherzyków fosfatydylocholinowych bądź w trakcie ich formowania, a następnie przeprowadzając przeciskanie przez filtry membranowe, filtrację żelową oraz ultrawierowanie uzyskaliśmy odpowiednio proteoliposomy PC-OMPs bądź OMPs-PC. Wielkość proteoliposomów obydwu formułacji była porównywalna i kształtowała się w zakresie 370 – 430 nm jak potwierdzono przy użyciu mikroskopu sił atomowych. W oparciu o techniki elektroforetyczne pokazaliśmy, że białkiem efektywnie inkorporowanym przez liposomy, niezależnie od sposobu tej inkorporacji, było białko błony zewnętrznej o masie ~60 kDa (później zidentyfikowane w spektrometrii mas LC-MS/MS jako białko OMP CD, dane nieopublikowane), **[publikacja P1]**.

Porównując immunogenności tych formułacji antygenowych w oparciu o metody ELISA i Western blot wykazałam, że zarówno uzyskane proteoliposomy (PC-OMPs, OMPs-PC) jak i proteomicelle (OMP-Z) były silnie immunogenne, a indukowana przez nie humoralna odpowiedź immunologiczna, wyrażona wysokimi mianami swoistych przeciwciał IgG anty-OMPs (~50 000), była porównywalna. Wykazałam ponadto, że wspomniane białko ~60 kDa (OMP CD) niezależnie od

sposobu asocjacji z liposomami zachowało immunoreaktywne epitopy. Brak wyraźnych różnic w immunogenności tego białka pomiędzy obydwoma użytymi formulacjami proteoliposomowymi oraz proteomicelami sugerował, że białko ~60 kDa (OMP CD) do zachowania właściwości immunogennych nie potrzebuje dwuwarstwy lipidowej, a jedynie obecności amfifilowych neutralnych związków bogatych w grupy hydrofobowe. Wówczas także zaobserwowałam silną krzyżową-reaktywność wspomnianego białka, wchodzącego w skład proteomiceli pozyskanych ze szczepów Mc1, Mc5, Mc6 i Mc8, z IgG wszystkich sześciu pul heterologicznych mysich anty-surowic. Poza modelem mysim, silną reaktywność krzyżowa białka ~60 kDa (OMP CD) z przeciwciałami klas IgG i IgA potwierdziłam także po zastosowaniu surowic ludzkich pochodzących zarówno od dzieci chorych po przebytych zapaleniu ucha środkowego wywołanego *M. catarrhalis* jak i tych zdrowych. Ponieważ przeciwciała IgG i IgA są markerami wtórnej odpowiedzi immunologicznej, ich powszechna krzyżowa reaktywność z białkiem OMP CD wskazywała, że białko to jest ważnym markerem antygenowym *M. catarrhalis* odpowiedzialnym na indukcję długotrwałej odporności **[publikacja P1]**. Reasumując, wykazałam, że silnie krzyżowo-reaktywne ~60 kDa białko CD błony zewnętrznej *M. catarrhalis* jest wysoce immunogenne będąc składnikiem zarówno proteoliposomów jak i proteomicelli. Pokazałam też, że jest ono odpowiedzialne za indukcję długotrwałej swoistej odpowiedzi humoralnej zarówno w modelu mysim jak i u człowieka, co w aspekcie silnych właściwości wirulentnych tego białka, może umożliwić nam zrozumienie stosunkowo niskiego stopnia patogenności *M. catarrhalis* u osób immunokompetentnych.

Ze względu na fakt zaobserwowania tak silnej reaktywności krzyżowej przeciwciał zarówno w modelu mysim jak i u ludzi, kolejnym celem moich badań była zakrojona na szerszą skalę ilościowa, jakościowa oraz funkcjonalna charakterystyka odpowiedzi immunologicznej wobec *M. catarrhalis*, której podstawą była owa reaktywność. Dysponując ośmioma pulami antysurowic (4 pule anty-Mc i 4 pule anty-OMPMc) wraz z magistrantką Moniką Piekut, której byłam opiekunem, z wykorzystaniem opracowanych przez siebie testów ELISA dla całych komórek bakterii (tzw. whole-cell ELISA), poprzez detekcję surowiczych mian swoistych przeciwciał IgG, określiłam zarówno stopień serokonwersji w surowicach homologicznych jak i stopień reaktywności krzyżowej przeciwciał w surowicach heterologicznych. Wykazałyśmy, że każda z ośmiu pul mysich anty-surowic była wysoce krzyżowo-reaktywna, rozpoznając powierzchniowe antygeny szczepów heterologicznych, przy czym miana przeciwciał IgG w surowicach powstałych w odpowiedzi na białka błony zewnętrznej (pule anty-OMPMc) były wyższe aniżeli w surowicach pochodzących od myszy immunizowanych całymi bakteriami (pule anty-Mc), **[publikacja P2]**.

Poza zaobserwowanymi różnicami ilościowymi pomiędzy przeciwciałami IgG surowic anty-OMPMc i anty-Mc, zadałam sobie pytanie czy różnią się one też jakościowo **[publikacja P2]**, jako że skuteczność protekcyjna przeciwciał jest w dużej mierze wypadkową dostępności, gęstości i

wartościowości antygenów oraz stężenia, powinowactwa i awidności przeciwciał [James i wsp., 2003; Reverberi i wsp., 2007]. W celu określenia awidności, przeprowadziliśmy analogiczne testy ELISA z wykorzystaniem całych komórek bakterii w obecności tiocyjanianu sodu (NaSCN), który powoduje rozerwanie słabych wiązań pomiędzy kompleksami antygen-przeciwciała. Wykazaliśmy, że relatywna awidność przeciwciał krzyżowo-reagujących była tylko nieznacznie mniejsza dla surowic anti-Mc lub porównywalna dla surowic anti-OMPMc w odniesieniu do surowic homologicznych. Wyrazem wysokiej awidności badanych przeciwciał była trwałość powstałych kompleksów antygen-przeciwciała i słabsza zdolność do ich dysocjacji. Ponadto przeciwciała surowic anti-OMPMc cechowały się generalnie większą awidnością w porównaniu do surowic anti-Mc. Wykazanie zbliżonych poziomów awidności pomiędzy wszystkimi surowicami anti-OMPMc sugerowało istnienie: (a) wysokiego stopnia konserwatywności epitopów pomiędzy badanymi szczepami, (b) porównywalnej dostępności antygenów dla przeciwciał, (c) niskiego stopnia zmienności w ekspresji powierzchniowych antygenów [publikacja P2].

Reasumując wykazałam, że badane zestawy immunogenów *M. catarrhalis* (całe bakterie, białka OMPs) indukują powstawanie krzyżowo-reagujących przeciwciał IgG o wysokiej awidności, zdolnych do efektywnego rozpoznawania antygenów powierzchniowych odmiennych fenotypowo szczepów *M. catarrhalis* oraz że przeciwciała IgG rozpoznające wyłącznie białka OMPs *M. catarrhalis* posiadają wyższą awidność niż te, które rozpoznają powierzchniowe antygeny całych komórek bakteryjnych.

Wyniki pokazujące istniejącą reaktywność krzyżową opisywanych tutaj mysich anti-surowic wobec innych patogennych bakterii układu oddechowego człowieka, a mianowicie *Haemophilus influenzae*, *Acinetobacter baumannii* i *Pseudomonas aeruginosa* zaprezentowałam także w postaci plakatu na konferencji 15th International Congress of Immunology ICI 22-27 VIII, 2013 w Mediolanie.

4.2.3. Działanie protekcyjne przeciwciał krzyżowo-reagujących

W kolejnym kroku należało udowodnić, że przeciwciała krzyżowo-reagujące z epitopami *M. catarrhalis* są ważne z immunologicznego punktu widzenia. Bo choć wysokie miana przeciwciał krzyżowo-reagujących zazwyczaj korelują z funkcją obronną z ich udziałem [Stalhammar-Carlemalm i wsp., 2000, De Jonge i wsp., 2003] zdarza się, że taka zależność nie występuje [Weynants i wsp., 2007]. Szczególnie gdy oprócz stężenia, powinowactwa i awidności, w grę wchodzi interakcje przeciwciał z receptorami FcR czy ze składową C1q dopełniacza [Sanders i wsp., 1995, Endeman i wsp., 2009, Higell i wsp., 2016]. Wynika stąd, że sama zdolność do wiązania antygeny nie gwarantuje uruchomienia mechanizmów obronnych. Dopiero potwierdzenie

działania tych mechanizmów w obecności przeciwciał jest warunkiem koniecznym aby przeciwciała nazwać w pełni funkcjonalnymi [publikacja P6].

Hipoteza postawiona przeze mnie na tym etapie badań brzmiała: Przeciwciała powstające w odpowiedzi na immunizację *M. catarrhalis* uruchamiają kluczowe mechanizmy efektorowe wobec szczepów heterologicznych. Weryfikacji tej hipotezy podjęłam się poprzez ocenę udziału przeciwciał krzyżowo-reagujących: (1) w aktywacji zależnego od dopełniacza bakteriobójczego działania surowicy, (2) we wzmacnieniu potencjału bakteriobójczego makrofagów linii THP-1 w procesie opsonofagocytozy (3) w blokowaniu adhezji bakterii do komórek nabłonka płucnego linii A549 [publikacja P2]. Do pomiaru litycznego działania dopełniacza wykorzystałam model oparty na zastosowaniu inaktywowanych termicznie poszczepiennych mysich surowic jako źródła przeciwciał oraz surowicy świnki morskiej jako egzogenego źródła dopełniacza. Wykazałam, że wobec szczepów homologicznych, zależna od dopełniacza aktywność surowic anty-OMPMc cechowała się większym potencjałem ochronnym, powodując zabicie tej samej 50% liczby bakterii przy wyższych mianach, niż aktywność surowic anty-Mc. Miało to zastosowanie także w odniesieniu do 3 z 4 szczepów heterologicznych. Wyjątek stanowił szczep Mc6, który był zabijany przez dopełniacz skuteczniej w obecności surowic anty-Mc, niż anty-OMPMc. Ponadto dla obydwu zestawów zastosowanych anty-surowic, wspomniane działanie bakteriobójcze było pozytywnie skorelowane z obecnością podklas IgG2a i IgG2b, zaangażowanych u myszy w aktywację dopełniacza szlakiem klasycznym. Istnienie korelacji tylko w układzie sumarycznej analizy podklas (IgG2a+IgG2b) sugerowało, że obie podklasy mogą wzajemnie się rekompensować oraz że do optymalnej funkcjonalności bakteriobójczej z ich udziałem potrzebna jest aktywność obydwu. Uzyskane obserwacje skłoniły do wnioskowania, że w uruchomieniu klasycznej drogi aktywacji dopełniacza przez przeciwciała krzyżowo-reagujące, kluczowa rola przypadała tym, które powstały w odpowiedzi na immunizację białkami błony zewnętrznej [publikacja P2]. Porównywalny lub nieznacznie wyższy potencjał ochronny krzyżowo-reagujących przeciwciał anty-OMPMc w porównaniu do anty-Mc wykazaliśmy natomiast w kolejnym cyklu doświadczeń z wykorzystaniem metody opsonofagocytozy. Udowodniliśmy w ten sposób, że przeciwciała te w zakresie mian od 1:30 do 1: 600 wzmagają pochłanianie i zabijanie, opsonizowanych nimi bakterii, przez ludzkie makrofagi linii THP-1. Z kolei pokazanie protekcyjnego anty-adhezyjnego działania badanych przeciwciał było możliwe dzięki zastosowaniu zmodyfikowanej przeze mnie metody opartej na immunoenzymatycznej detekcji (awidyna-peroksydaza chrzanowa) biotynylowanych bakterii adherujących do ludzkiej linii epitelialnej płuc A549. Jak udowodniłam eksperymentalnie, przeciwciała reagujące-krzyżowo z surowic anty-OMPMc oraz anty-Mc efektywnie blokowały adhezję bakterii do komórek nabłonka. Również i w tym przypadku, nieznacznie silniejszy efekt wywierały przeciwciała surowic anty-OMPMc. W celu wyznaczenia progu protekcji (*protective*

threshold) dla każdej z metod, porównałam następnie rozkłady poszczególnych funkcji obronnych dla przeciwciał krzyżowo-reagujących oraz działających w układach homologicznych. Na podstawie wyników analiz stwierdziłam, że najefektywniejszym mechanizmem obronnym wobec *M. catarrhalis*, który jest aktywowany przez co najmniej 75% przeciwciał krzyżowo-reagujących, jest klasyczny szlak aktywacji dopełniacza, w następnej kolejności opsonofagocytoza (co najmniej 60% przeciwciał) i blokowanie adherencji [publikacja P2]. Otrzymane wyniki, pozwoliły mi jednoznacznie stwierdzić, że przeciwciała reagujące-krzyżowo z antygenami powierzchniowymi *M. catarrhalis*, cechują się silnym potencjałem obronnym wobec fenotypowo różnych szczepów tej bakterii. Są zatem w pełni funkcjonalne zarówno na początkowym etapie zakażenia poprzez neutralizację bakterii i hamowanie adhezji oraz na późniejszym etapie jego trwania poprzez uruchamianie mechanizmów obrony nieswoistej typu humoralnego (dopełniacz) i komórkowego (fagocytoza).

Uzyskane wyniki zaprezentowałam także w postaci plakatu na 15th International Congress of Immunology ICI 22-27 VIII, 2013 w Mediolanie.

4.2.4. Identyfikacja oraz analiza immunoproteomiczna i bioinformatyczna białek bakteryjnych rozpoznawanych przez przeciwciała krzyżowo-reagujące

W kolejnym etapie badań zadałam sobie pytanie, które konkretnie powierzchniowe antygeny *M. catarrhalis* i w jakim stopniu są rozpoznawane przez przeciwciała krzyżowo-reagujące, a które działają tylko w układach homologicznych oraz jaka jest ewolucja kodujących je genów [publikacja P3]. W modelu tych badań jako źródło bakteryjnych antygenów wykorzystałam izolowane i oczyszczone drogą ultrafiltracji i ultrawierwienia pęcherzyki błony zewnętrznej (OMVs) jako najlepsze ilościowe i jakościowe odwzorowanie garnituru antygenowego komórki. Źródłem przeciwciał były mysie surowice poszczepienne anti-Mc o udokumentowanej w publikacji P2 funkcji efektorowej. Do współpracy, oprócz doktorantów Rafała Seredyńskiego i Justyny Roszkowiak, której jestem promotorem pomocniczym, zaprosiłam dr hab. prof. Pawła Mackiewicza z Zakładu Genomiki Wydziału Biotechnologii UW, będącego ekspertem w analizach bioinformatycznych. W badaniach immunoproteomicznych stosowaliśmy standardową elektroforezę SDS-PAGE oraz elektroforezę dwukierunkową (2D SDS-PAGE) połączoną z analizą spektrometrii mas LC-MS/MS i Western blot-em [publikacja P3]. Analiza LC-MS/MS białek immunoreaktywnych została wykonana we współpracy z dr Siobhán McClean (University College Dublin, Irlandia), którą poznałam w trakcie uczestnictwa we wspólnym projekcie C.O.S.T Action BM1003. „Microbial cell surface determinants of virulence as targets for new therapeutics in cystic fibrosis” (2011-2014).

Do analiz immunoproteomicznych wybrałam pęcherzyki OMVs produkowane przez szczepy Mc6 i Mc8 *M. catarrhalis*, różniące się fenotypowo oraz reprezentujące odmienne linie filogenetyczne w obrębie gatunku. Sekwencje całych genomów tych szczepów, zdeponowane w bazie NCBI pod numerami CP010901 (Mc6) i CP010902 (Mc8), pozyskałam dzięki współpracy z dr Darrenem Smithem z Northumbria University, UK. Dla każdego szczepu zidentyfikowaliśmy kilkadziesiąt immunoreaktywnych spotów reprezentujących 13 (Mc6) i 14 dla (Mc8) odmiennych białek. Oprócz identyfikacji białek błony zewnętrznej OMP CD, OMP E, OMP M35, MhuA, CopB, TbpB, OMPG1b/OlpA i Hag/MID, w pęcherzykach OMVs *M. catarrhalis*, wykazaliśmy obecność 9 dodatkowych, dotychczas nie opublikowanych białek, włączając w to zarówno białka powierzchniowe: UspA1, FbpA, MhuA, LbpB, TbpA, MipA, cytoplazmatyczne jak chaperon GroEL, dehydrogenazę dihydrolipoamidową (Lpd) czy peryplazmatyczne np. Ycel, **[publikacja P3]**. Po określeniu ilościowych różnic w reaktywności krzyżowej przeciwciał IgG z rozpoznawanymi białkami oraz znając funkcje tych białek z dostępnej literatury ustaliłam, że celem przeciwciał krzyżowych są zasadniczo białka będące kluczowymi czynnikami wirulencji *M. catarrhalis*. I są one tak jak UspA1, OMP CD, Hag/MID zaangażowane w procesy adhezji i inwazji do komórek gospodarza, bądź tak jak UspA1, OMP CD, OMP E w mechanizmy umożliwiające unikanie ataku bądź aktywną ochronę bakterii przed układem dopełniacza. Do tej „wirulentnej” grupy zaliczyłam także immunogenne białka GroEL i Lpd, których immunogenność u *M. catarrhalis* pokazaliśmy po raz pierwszy **[publikacja P3]**, a których potencjał wirulentny oraz immunogeny dla innych patogenów został opisany [Hallström i wsp., 2015, Shinoy i wsp., 2013]. Drugą grupę immunogennych antygenów *M. catarrhalis*, nie klasyfikowanych jako czynniki wirulencji, stanowiły białka błonowe zaangażowane w metabolizm żelaza. Te immunogenne białka mimo, iż cechowały się umiarkowaną reaktywnością z anty-surowicami homologicznymi, nie wykazywały lub wykazywały znikomą reaktywność z przeciwciałami reagującymi krzyżowo (anty-surowice heterologiczne). Do tej grupy zakwalifikowałam: białka LbpB (wiążące laktoferynę), TbpB (wiążące transferynę), CopB (wiążące laktoferynę oraz transferynę) czy MhuA (wiążące hemoglobinę). W zgodzie z tymi wynikami, brak reaktywności krzyżowej zaobserwowałam także wobec peryplazmatycznego białka wiążącego żelazo FbpA **[publikacja P3]**.

Wyniki naszych badań eksperymentalnych potwierdziliśmy następnie analizą bioinformatyczną. W oparciu o 15 różnych metod bioinformatycznych, umożliwiających analizę epitopów, wytypowaliśmy przewidywane miejsca epitopów we wszystkich zidentyfikowanych przez nas immunogennych białkach czyli zarówno tych „wirulentnych” jak i „niewirulentnych”. W analizach tych za potencjalne epitopy uznaliśmy miejsca w sekwencji danego białka, które były rozpoznawane przez więcej niż 50% stosowanych metod. Analizy nasze wykazały, że sekwencje epitopów wchodzących w skład białek cechujących się słabą lub brakiem reaktywności z

przeciwciałami krzyżowo-reagującymi były bardziej zmienne aniżeli te należące do białek silnie rozpoznawanych przez te przeciwciała. W oparciu o metody bioinformatyczne wykazaliśmy zatem, że większa skuteczność działania przeciwciał krzyżowo-reagujących jest adresowana do białek o bardziej konserwatywnym garniturze antygenowym **[publikacja P3]**.

Istotnym zatem osiągnięciem było pokazanie określonego wzoru reaktywności krzyżowej w obrębie badanego repertuaru przeciwciał. Zgodnie z nim podstawą zależnej od przeciwciał krzyżowych ochrony wobec gatunku *M. catarrhalis* jest blokowanie czynników wirulencji promujących adhezję i/lub zaangażowanych w unikanie ataku ze strony układu dopełniacza. Brak wspomnianej ochrony w układzie krzyżowym dotyczy natomiast białek odpowiedzialnych za metabolizm żelaza, pomimo iż wiele z nich posiada właściwości immunogenne. Otrzymane wyniki znacząco poszerzyły wiedzę na temat funkcjonowania przeciwciał krzyżowo-reagujących **[publikacja P3]**.

Postępująca szybkość oraz duży spadek kosztów sekwencjonowania całych genomów mikroorganizmów, umożliwia ich analizę w skali globalnej w kontekście patogenności, immunogenności, ewolucji czy interakcji patogen-gospodarz. Dlatego też identyfikacji eksperymentalnej wyżej wymienionych białek towarzyszyła obszerna analiza bioinformatyczna 27 kompletnych genomów *M. catarrhalis*, w tym 4 nowo zsekwencjonowanych przez nas genomów [CP010573, CP010900, CP010901, CP010902] *M. catarrhalis* z kolekcji własnej. W analizach porównawczych uwzględniono także 4 genomy innych gatunków z rodzaju *Moraxella* oraz 3 przedstawicieli rodzaju *Acinetobacter*, należącego do tej samej rodziny *Moraxellaceae*. Do tych analiz, oprócz naszych wyników eksperymentalnych, włączyliśmy także inne opublikowane dane pokazujące dystrybucję białek w pęcherzykach OMVs *M. catarrhalis* [Schaar¹ i wsp., 2011]. Nasze analizy wykazały, że białka *M. catarrhalis* wchodzące w skład pęcherzyków OMVs są kodowane przez geny zorganizowane w 63 grupy ortologiczne, wśród których istnieje 5 grup charakterystycznych tylko dla tego gatunku bakterii, a mianowicie: IclR, Lgt1, OppB, cHP Mc10, and HP Mc12. W oparciu o sekwencje ortologiczne genów kodujących białka OMVs, przeprowadziliśmy analizy filogenetyczne. Na ich podstawie oszacowaliśmy zawartość tych genów u przodków oraz ich nabywanie i utratę w poszczególnych liniach filogenetycznych. Wykazaliśmy, że z wyjściowych 40 genów kodujących białka OMVs i występujących u wspólnego przodka *Moraxella* i *Acinetobacter*, w trakcie ewolucji rodzaju *Moraxella* doszło do podwojenia liczby tych genów, w porównaniu do rodzaju *Acinetobacter* i gatunków *Moraxella* patogennych dla zwierząt. Wskazywało to na sukcesywny wzrost genów kodujących białka OMVs u *M. catarrhalis*. Takiego trendu nie zaobserwowaliśmy dla liczby genów kodujących cały proteom. Na podstawie przeprowadzonych analiz można zatem zakładać, że genomy gatunku *M. catarrhalis* w toku ewolucji zostały istotnie wzbogacone w białka dystrybuowane przez OMVs. Ponieważ rola OMVs

wiąże się zarówno z patogennością jak i fizjologią bakterii, udokumentowana przez nas tendencja do ewolucyjnego zwielokrotniania ich białkowej zawartości może być hipotetycznie nowym dowodem adaptacji patogenów, w celu optymalizacji ich sukcesu kolonizacyjnego [publikacja P3].

4.3. Rola neuropeptydów w obronie wobec *Moraxella catarrhalis*

4.3.1. Działanie bakteriobójcze i immunomodulujące

Na przestrzeni lat 2008-2018, równoległe z badaniami nad obronną rolą przeciwciał krzyżowo-reagujących, moje zainteresowania naukowe skupiły się na potencjale obronnym neuropeptydów. Już jakiś czas temu związki te przestały być postrzegane jedynie jako neuroprzekaźniki i wciąż przybywa dowodów dokumentujących ich zgoła odmienną rolę w formowaniu lokalnych barier obronnych. W tym świetle neuropeptydy definiuje się jako czynniki nieswoistej odpowiedzi humoralnej [Brogden i wsp., 2005, Souza-Moreira i wsp., 2011].

Ta nowa rola oraz wyniki badań własnych [publikacja P4] zainspirowały mnie do napisania pracy przeglądowej na temat przeciwmikrobowego działania neuropeptydów takich jak neuropeptyd Y (NPY), substancja P (SP), peptyd związany z genem kalcytoniny (CGRP), adrenomedulina, wazoaktywny peptyd jelitowy (VIP) oraz hormon stymulujący melanocyty (α -MSH). Opisałam i usystematyzowałam w niej wielokierunkową przeciwmikrobową aktywność wymienionych związków, włączając w to ich bezpośrednie działanie bójcze na bakterie, grzyby i pierwotniaki oraz pośrednie - immunomodulujące wobec mechanizmów odpowiedzi nieswoistej oraz swoistej. Moje nowatorskie podejście do tematu, w aspekcie zależnej od neuropeptydów modulacji odpowiedzi nieswoistej, różnicowało neuropeptydy na związki o działaniu: (1) przeciwnym oraz bimodalnym, (2) synergistycznym oraz addytywnym czy wreszcie (3) zależnym bądź nie od receptorów [publikacja P7]. Taki pogląd i koncepcja publikacji umożliwiły mi zaproszenie do współpracy specjalistę od neuropeptydów, dr Fionnuala T. Lundy z Queens University of Belfast, UK.

We wspomnianej pracy oryginalnej [publikacja P4] przeanalizowałam zarówno bezpośrednie - bakteriobójcze jak i pośrednie - immunomodulujące działanie neuropeptydów NPY, SP, CGRP oraz somatostatyny na zakażenie ze strony *M. catarrhalis*. Do badań włączyłam także inny wiodący patogen układu oddechowego - nietypową *H. influenzae*. W ramach immunomodulacji, badałam wpływ neuropeptydów na mechanizm fagocytozy, najsłabiej poznany mechanizm obronny wobec *M. catarrhalis*. Pomysłem oryginalnym było założenie, że modulujące działanie neuropeptydów może zależeć od sposobu rozpoznawania patogenu przez komórkę żerną (opsonofagocytoza z udziałem IgG versus fagocytoza bez udziału opsonin). Zastosowany układ badawczy bazował zatem na izolowanych ludzkich neutrofilach jako komórkach żernych i

bakteriach wyznakowanych fluorochromem FITC (izotiocyanian fluoresceiny), poddanych następnie bądź nie opsonizacji mysimi swoistymi przeciwciałami IgG. Porównując kinetykę obydwu układów tzn. fagocytozy zależnej od obecności opsonin i tej pozbawionej opsonin, z wykorzystaniem cytometru przepływowego, wykazałam, że pochłanianie bakterii obydwu testowanych gatunków bakterii, z definicji wzmacnione w układzie opsonizowanym, było jeszcze bardziej zintensyfikowane w obecności fizjologicznych stężeń (10^{-8} M) neuropeptydów NPY i CGRP. Wskazywało to na addytywne działanie przeciwciał i neuropeptydów na etapie pochłaniania **[publikacja P4]**. Następnie zbadalam, czy inne etapy fagocytozy bakterii opsonizowanych bądź nieopsonizowanych, są również modulowane przez badane neuropeptydy. Do analizy wybrałam wybuch tlenowy, który jest oznaką uruchomienia, zależnych od tlenu i oksydazy NADPH, mechanizmów bójących neutrofilów [El-Benna i wsp., 2016]. Poprzez chemiluminometryczny pomiar generowania reaktywnych form tlenu (ROS) pokazałam, że choć ROS powstawały niezależnie od sposobu rozpoznania i pochłonięcia bakterii i choć układy opsonizowane z definicji pracowały silniej niż nieopsonizowane, intensyfikacja wybuchu tlenowego w obecności CGRP i w mniejszym stopniu też NPY była charakterystyczna jedynie dla układów bez opsonin, natomiast jego hamowanie – dla układów z opsoninami. Wyniki te sugerowały, że wzmożona produkcja ROS przy braku przeciwciał może być efektem bezpośredniego oddziaływania neuropeptydów z endotoksyną, co byłoby zgodne z danymi dotyczącymi innych peptydów kationowych. Z kolei wykazanie, że NPY i CGRP stymulują pochłanianie opsonizowanych przeciwciałami bakterii bez dalszej intensyfikacji wybuchu tlenowego (w porównaniu do opsonizowanych układów kontrolnych bez neuropeptydów), wskazywało, że zależną od nich amplifikację metabolizmu tlenowego neutrofilów w trakcie fagocytozy można przypisać jedynie do początkowej odpowiedzi fagocytów, która nie obejmuje jeszcze współdziałania przeciwciał **[publikacja P4]**. Wyniki moich badań po raz pierwszy pokazały, że różne etapy procesu fagocytozy (pochłanianie, wybuch tlenowy) bakterii *M. catarrhalis* i *H. influenzae* z udziałem neutrofilów są w odmienny sposób modulowane (stymulacja versus redukcja) przez fizjologiczne stężenia NPY i CGRP w zależności od obecności przeciwciał **[publikacja P4]**. Uzyskane wyniki zaprezentowałam także w postaci plakatu na 15th International Congress of Immunology ICI 22-27 VIII, 2013 w Mediolanie.

Poprzez eksperymenty dotyczące bezpośredniej przeciwbakteryjnej aktywności neuropeptydów pokazałam, że trzy z nich tj. NPY, CGRP oraz SP działały bakteriobójczo wobec użytych szczepów *M. catarrhalis* jak i nietypowej *H. influenzae*. Efekt ten zachodził jednak jedynie przy niefizjologicznych (10^{-4} M i 10^{-5} M) stężeniach, co wskazuje, że z medycznego punktu widzenia jego znaczenie może być niewielkie. Gatunkiem wrażliwszym była *M. catarrhalis*. Porównując potencjał bakteriobójczy, badane neuropeptydy uszeregowałam następująco: NPY > CGRP ≥ SP >> SOM **[publikacja P4]**. Takie uszeregowanie wydaje się mieć swoje odzwierciedlenie

w bakteriobójczym działaniu wymienionych neuropeptydów również na inne bakterie gram-ujemne **[publikacja P7]**. Działanie bakteriobójcze było skorelowane z dynamiką poszczególnych neuropeptydów do permeabilizacji błony komórkowej bakterii gram-ujemnych, co wykazałam kolorymetrycznie z udziałem mutanta *E. coli* ML-35p o konstytutywnej ekspresji β -galaktozydazy. Badania pokazały, że potencjał permeabilizacyjny badanych neuropeptydów był skorelowany z ich efektem bakteriobójczym wobec *M. catarrhalis* [publikacja P4], co wskazywało, że za zależne od neuropeptydów zabicie bakterii odpowiada destabilizacja błony komórkowej.

Następnie, w oparciu o wyniki eksperymentalne badań własnych jak również badań innych autorów, przeprowadziłam meta-analizę zależności przeciwbakteryjnej peptydów, z uwzględnieniem zarówno działania bakteriobójczego jak i permeabilizacyjnego, od ich cech fizykochemicznych oraz składu aminokwasowego. Pozwoliła ona ustalić, że obecność w łańcuchu aminokwasowym cięższych aminokwasów, z większą zawartością grup polarnych i reszt kwasowych oraz wyższym momentem hydrofobowym sprzyja zwiększeniu bezpośredniej aktywności przeciwbakteryjnej **[publikacja P4]**. Wyniki naszych badań wskazywały, że interakcje peptydów z błonami komórkowymi bakterii są wypadkową delikatnej równowagi sił elektrostatycznych oraz hydrofobowych oraz że uniwersalna i prosta korelacja pomiędzy aktywnością antymikrobową i konkretną cechą strukturalną peptydu jest rzadko demonstrowana **[publikacja P4]**. Podsumowując, moim osiągnięciem było pokazanie, że neuropeptydy CGRP i NPY w stężeniach fizjologicznych wywierają, uwarunkowane obecnością immunoglobulinowych opsonin, działanie immunomodulujące na komórkową odpowiedź nieswoistą - fagocytozę neutrofilów. Dodatkowo pokazałam, że NPY, SP i CGRP w wyższych stężeniach działają bakteriobójczo wobec *M. catarrhalis* i nietypowej *H. influenzae* [publikacja P4].

4.3.2. Działanie przeciwzapalne

Wiedząc, że neuropeptydy mogą wzmacniać komórkową odpowiedź nieswoistą wobec *M. catarrhalis*, zadałam sobie pytanie czy są też w stanie redukować reakcje zapalne z jej udziałem. Do badań oprócz CGRP wybrałam w tym wypadku SP – oba o znanym działaniu prozapalnym, ale też rosnącym potencjale przeciwzapalnym [Holzmann, 2013, Dang i wsp., 2017, Lim i wsp., 2017]. Wiadomo, że *M. catarrhalis* uczestniczy w zaostrzaniu przewlekłej obturacyjnej choroby płuc (POCHP) [Parameswaran i wsp., 2011], w patogenezie której dominującą rolę przypisuje się komórkom nabłonka płucnego oraz rekrutowanym neutrofilom [O'Donnell i wsp., 2006, Perez i Murphy, 2017]. W swoich badaniach skupiłam się zatem na charakterystyce zależnej od neuropeptydów modulacji potencjału prozapalnego właśnie tych komórek poddanych stymulacji bakteryjnej *in vitro* **[publikacja P5]**.

I tak oceniając odpowiedź prozapalną komórek epitelialnych ludzkiej linii A549, przeanalizowałam zarówno ich zdolność do produkcji β -defensyny 2 (hBD-2) jako istotnego chemoatraktanta neutrofilów, jak również podatność A549 na apoptozę. Z kolei odpowiedź prozapalną ludzkich neutrofilów weryfikowałam na podstawie ich zdolności do degranulacji i uwalniania, bogatych w mediatory zapalenia, ziarnistości azurofilnych oraz swoistych **[publikacja P5]**. We wszystkich doświadczeniach jako stymulatory wykorzystałam pęcherzyki OMVs *M. catarrhalis* szczepu Mc6, wiedząc że niosą one arsenał kluczowych czynników wirulencji **[publikacja P3]** oraz że zapewne tak jak inne OMVs tej bakterii są uwalniane w trakcie zakażenia *in vivo* [Tan i wsp., 2007].

Systemy immunoenzymatyczne typu ELISA są zasadniczo zbyt mało czułe do pomiaru produkcji β -defensyny hBD-2 w warunkach *in vitro*. Dlatego do oceny ilościowych różnic w jej ekspresji wykorzystaliśmy metody biologii molekularnej. Posługując się nimi, wraz z dr Jackiem Skatą z naszego Instytutu, uzyskaliśmy konstrukt złożony z wektora plazmidowego zawierającego bioluminescencyjny lucyferazowy gen reporterowy (pGL4) oraz wklonowany promotor dla hBD-2. Konstrukt pGL4-hBD-2 przy pomocy transfekcji wprowadzaliśmy do komórek linii A549. Poprzez dokonany na luminometrze pomiar, świadczącej o ekspresji hBD-2, aktywności lucyferazy w obecności lucyferyny, wykazaliśmy, że pęcherzyki OMVs są silnymi stymulatorami hBD-2 jedynie w obecności interleukiny IL-1 β oraz że najsilniejsza ekspresja hBD-2 zależna od IL-1 β ma miejsce 8 godzin po podaniu stymulatorów **[publikacja P5]**. Paradoksalnie, jedną ze strategii kolonizacji nabłonka płucnego przez *M. catarrhalis* jest negatywna regulacja stanu zapalnego tej tkanki. Wyciszenie zależnego od TLR-2 i NF- κ B zapalenia odbywa się poprzez równoczesną ligację epitelialnego receptora CEACAM-1 przez bakteryjne białko powierzchniowe UspA1 [Slevogt i wsp., 2008]. Ponieważ jako stymulatorów w naszym modelu badawczym używaliśmy pęcherzyki OMVs szczepu Mc6 posiadające białko UspA1 **[publikacja P3]** oraz stosując immunofenotypowanie potwierdziliśmy cytometrycznie, że znacząca frakcja komórek A549 cechowała się ekspresją CEACAM-1 **[publikacja P5]**, pokazana przez nas prozapalna odpowiedź komórek A549 na stymulację OMVs wskazywała, że oprócz interakcji pomiędzy wspomnianymi ligandami, wpływ środowiska immunologicznego w postaci IL-1 β jest tu fundamentalny. Pokazaliśmy następnie, że ten wysoce synergistyczny efekt działania OMVs i IL-1 β , skutkujący wzmożoną ekspresją hBD-2, był znamienne (~ 3-krotnie) niwelowany przez neuropeptydy SP i CGRP, używane w stężeniach fizjologicznych. Pokazany przez nas hamujący wpływ SP i CGRP na ekspresję silnego neutrofilowego chemoatraktanta - hBD-2, w linii A549 stymulowanej OMVs i IL-1 β sugeruje, że oba neuropeptydy mają potencjał do osłabienia napływu neutrofilów do płuc, a tym samym do redukcji reakcji zapalnej **[publikacja P5]**.

Poza indukowaną *M. catarrhalis* produkcją prozapalnych cytokin, komórki epitelialne płuc potrafią też internalizować *M. catarrhalis* [Slevogt i wsp., 2007]. Kiedy po tym następuje apoptoza,

złuszczenie i usuwanie nabłonka, w sposób naturalny dochodzi do redukcji liczby bakterii. W przeciwnym razie, wzmożona apoptoza połączona z nieefektywną eliminacją podtrzymuje chroniczny stan zapalny. Co ciekawe całe komórki *M. catarrhalis* mogą indukować apoptozę nabłonka poprzez wspomnianą interakcję UspA1-CEACAM1 [N'Guessan i wsp., 2007]. Powiązanie tych faktów skłoniło mnie do zbadania czy same pęcherzyki OMVs *M. catarrhalis* również działają cytotoksycznie na komórki linii A549, czy u podłoża tego zjawiska leży apoptoza oraz czy neuropeptydy SP i CGRP mogą również w tym przypadku wywierać efekt ochronny **[publikacja P5]**. Byłoby to istotne, jeśli podkreśli się, że wzmożona produkcja OMVs generalnie zachodzi w warunkach stresowych środowiska, którymi z pewnością jest toczący się proces zapalny. Dzięki zastosowaniu kolorymetrycznego testu MTT oraz analizy cytometrycznej wykazałam, że posiadające białko UspA1 pęcherzyki OMVs szczepu Mc6 **[publikacja P3]** działały cytotoksycznie na nabłonek linii A549 oraz że u podłoża tego efektu leżała programowana śmierć, która po 24 godzinach dotknęła ~ 30% komórek **[publikacja P5]**. Następnie pokazałam, że linia A549 w fazie post-konfluentnej była mieszaniną frakcji komórek CEACAM1-pozytywnych (~30%) i CEACAM1-negatywnych (~70%). Pokrywające się rezultaty odsetków komórek CEACAM-1-pozytywnych oraz tych apoptotycznych sugerowały, że zdolność OMVs Mc6 niosących UspA1 do indukowania apoptozy zależy w dużym stopniu od interakcji UspA1-CEACAM1. Nie można jednakże wykluczyć też wpływu innych składowych OMVs na obserwowane zjawisko. Następnie pokazaliśmy, że w obecności fizjologicznych stężeń zarówno SP jak i CGRP, ilość komórek apoptotycznych indukowanych pod wpływem OMVs zmalała, co korelowało też ze zniwelowanym przez neuropeptydy efektem cytotoksycznym OMVs. Uzyskane wyniki świadczyły zatem, że oba neuropeptydy „ratują” znaczącą frakcję komórek nabłonkowych w warunkach *in vitro*. Hipotetycznie mogłyby zatem zminimalizować szkodliwą kolonizację i wynikające z niej patofizjologiczne konsekwencje zakażenia. Wyniki naszych badań jako pierwsze pokazały, że same pęcherzyki OMVs *M. catarrhalis* w znaczący sposób mogą indukować obumieranie nabłonka płuc linii A549, a zatem nasilać stan zapalny. Ponadto, pokazany przez nas hamujący wpływ SP i CGRP na apoptozę linii A549 w warunkach stymulacji *M. catarrhalis* sugeruje, że związki te mogą przyczyniać się do osłabienia stanu zapalnego **[publikacja P5]**.

Kolejny aspekt naszych badań był ukierunkowany na sprawdzenie w warunkach *in vitro* czy i w jakim stopniu neuropeptydy CGRP i SP modulują zależną od OMVs degranulację neutrofilów. Co ciekawe, do momentu publikacji naszej pracy **[publikacja P5]**, nie było danych na temat udziału bakteryjnych OMVs w procesie degranulacji (egzocytozy) tych komórek. Degranulacja oprócz fagocytozy i produkcji zewnątrzkomórkowych sieci neutrofilowych (NET), zaliczana jest do strategii antymikrobowych neutrofilów [Papayannopoulos i Zychlinsky, 2009, Kruger i wsp., 2015]. Jednakże w sytuacji wzmożonej aktywacji komórek w ognisku zapalnym, szczególnie w jego

przewlekłej formie, towarzysząca aktywacji egzocytoza jest zjawiskiem ze wszech miar szkodliwym, jako że prowadzi do destrukcji sąsiednich tkanek [Soehnlein i wsp., 2008]. Po indukcji degranulacji w obecności cytochalazyny, stopień degranulacji izolowanych ludzkich neutrofilów ocenialiśmy poprzez pomiar markerów charakterystycznych dla określonych rodzajów ziaren neutrofilowych. Dokonując fluorymetrycznych pomiarów aktywności elastazy oraz immunoenzymatycznych pomiarów stężenia lipocaliny związanej z żelatynazą neutrofilii (NGAL) pokazaliśmy, że OMVs *M. catarrhalis*, w sposób zależny od stężenia, indukują proces egzocytozy zarówno ziarnistości azurofilnych (elastaza) jak i swoistych (NGAL). Następnie udokumentowaliśmy, że neuropeptydy CGRP i w mniejszym stopniu SP hamują egzocytozę ziarnistości swoistych, nie zaś azurofilnych, wykazując zatem pewnego rodzaju selektywność działania. Hamujące działanie obydwu neuropeptydów potwierdziliśmy następnie z wykorzystaniem cytometru przepływowego poprzez wizualizację markera egzocytozy ziaren wtórnych neutrofilów, a mianowicie CD66b. Ekspresja tego markera na powierzchni komórek, wzmocniona po ekspozycji na OMVs, ulegała osłabieniu w obecności CGRP i w mniejszym stopniu z SP. Był to kolejny dowód na to, że szczególnie neuropeptyd CGRP odpowiada *in vitro* za wygaszanie odpowiedzi prozapalnej, w którą zaangażowane są neutrofile. Ponieważ ziarnistości swoiste są bogate w cząsteczki adhezyjne leukocytów np. integryny, rezultatem hamowania ich uwalniania w warunkach *in vivo* w obecności CGRP, może więc być osłabienie zdolności do adhezji neutrofilów. Otrzymane wyniki są pierwszym dowodem uczestnictwa pęcherzyków OMVs *M. catarrhalis* w procesie degranulacji ludzkich neutrofilów oraz dowodem na udział CGRP i SP w hamowaniu uwalniania ziaren swoistych w warunkach *in vitro* [publikacja P5].

Istotnym osiągnięciem było dostarczenie nowych dowodów immunomodulującego działania neuropeptydów CGRP i SP wobec ludzkiej linii epitelialnej płuc oraz neutrofilów w warunkach stymulacji *M. catarrhalis*. Obejmowały one efekty przeciwzapalne takie jak hamowanie produkcji chemoatraktantów neutrofilowych (hBD-2), hamowanie apoptozy oraz osłabianie degranulacji.

Podsumowanie najważniejszych wyników stanowiących osiągnięcie naukowe:

Badania nad rolą przeciwciał krzyżowo-reagujących oraz neuropeptydów w obronie gospodarza przed *M. catarrhalis* poszerzyły naszą wiedzę na temat anty-wirulentnych i modulujących właściwości tych związków wobec tej bakterii, jej patogenezę oraz interakcji z gospodarzem. Efekty tych badań można podsumować następująco:

- ✓ Udowodniono, że przeciwciała IgG reagujące-krzyżowo z antygenami odmiennych fenotypowo i filogenetycznie odległych szczepów gatunku *M. catarrhalis*, cechują się wysoką awidnością oraz są w pełni funkcjonalne w zakresie uruchamianych przez nie nieswoistych mechanizmów

obronnych człowieka takich jak aktywacja dopełniacza, wzmaganie fagocytozy makrofagów czy blokowanie adherencji do nabłonka płucnego **[publikacja P2]**. Można zatem wnioskować, że przeciwciała te stanowią integralną część humoralnej odpowiedzi immunologicznej wobec tej bakterii.

- ✓ Zidentyfikowano immunoreaktywne białka pęcherzyków błony zewnętrznej OMVs *M. catarrhalis* włączając w to kilka ich nowych składowych m.in. białka powierzchniowe UspA1, FbpA, MhuA, LbpB, TbpA, MipA czy cytoplazmatyczne jak GroEL, Lpd. Wykazano, że istnieje określony profil reaktywności krzyżowej przeciwciał, w którym odpowiedź z ich udziałem nakierowana jest na rozpoznanie czynników wirulencji *M. catarrhalis* odpowiedzialnych za adhezję oraz unikanie ataku ze strony dopełniacza, nie dotyczy natomiast immunogennych białek zaangażowanych w metabolizm żelaza **[publikacja P3]**.
- ✓ Wykazano, że jednym z induktorów długotrwałej swoistej odpowiedzi humoralnej zarówno w modelu mysim jak i u człowieka jest krzyżowo-reaktywne i silnie ekspresjonowane ~ 60 kDa białko błony zewnętrznej OMP CD *M. catarrhalis*, które zachowuje właściwości immunogenne będąc składnikiem proteomiceli, proteoliposomów oraz pęcherzyków OMVs **[publikacja P1, publikacja P3]**.
- ✓ Ustalono, że geny kodujące białka zawarte w pęcherzykach błony zewnętrznej OMVs *M. catarrhalis* uległy w toku ewolucji podwojeniu **[publikacja P3]**. Rezultatem tego może być lepsza adaptacja bakterii i optymalizacja ich sukcesu kolonizacyjnego.
- ✓ Wykazano, że neuropeptydy NPY i CGRP wykazują działanie modulujące na mechanizm fagocytozy ludzkich neutrofilów wobec *M. catarrhalis* i *H. influenzae* **[publikacja P4]**.
- ✓ Udowodniono, że neuropeptydy CGRP i SP w warunkach zakażenia *M. catarrhalis* wykazują immunomodulujące, a także przeciwzapalne działanie wobec komórek nabłonka płuc oraz neutrofilów odpowiednio poprzez efekty anty-apoptotyczne i hamowanie produkcji chemoatraktantów (hBD-2) oraz spowalnianie intensywności degranulacji **[publikacja P5]**. Rezultatem tego może być zmniejszenie reakcji zapalnej dróg oddechowych.
- ✓ Udowodniono, że pęcherzyki błony zewnętrznej OMVs *M. catarrhalis* wykazują działanie prozapalne i/lub proapoptotyczne wobec komórek epitelialnej linii płuc oraz neutrofilów **[publikacja P5]**
- ✓ Dokonano obszernego i gruntownego podsumowania aktualnego stanu wiedzy wraz z jego interpretacją na temat obronnej i modulującej roli przeciwciał krzyżowo-reagujących oraz neuropeptydów wobec różnych grup mikroorganizmów **[publikacja P6, publikacja P7]**.

5. Plany na przyszłość

Moja tematyka badawcza skupia się na oddziaływaniach patogen-gospodarz. Obecnie, współpracując z dr Sióbhán McClean (UK) oraz dr hab. Aleksandrą Mirończuk (UP, Wrocław), finalizuję badania naukowe dotyczące mechanizmu działania ludzkiej elastazy neutrofilowej wobec *M. catarrhalis*. Jako efekt współpracy z prof. Kristianem Riesbeckiem z Lund University (Szwecja) oraz prof. Pawłem Mackiewiczem zajmuję się eksperymentalną i bioinformatyczną analizą reakcji krzyżowych przeciwciał IgG z białkami błony zewnętrznej PD, PE i PF *Haemophilus influenzae*. W tematyce wzajemnych zależności między mechanizmami obronnymi a infekcją, szczególnie interesuje mnie rola pęcherzyków OMVs *M. catarrhalis* w modulacji odpowiedzi immunologicznej wobec innych patogenów układu oddechowego mogących występować u człowieka w koinfekcji z gatunkiem *M. catarrhalis*, a mianowicie *Haemophilus influenzae*, *Acinetobacter baumannii* i *Pseudomonas aeruginosa*. W przygotowaniu jest grant ministerialny z tej tematyki.

6. Omówienie wybranych pozostałych osiągnięć naukowych

6.1. Przed uzyskaniem stopnia doktora

Moja praca z *M. catarrhalis* rozpoczęła się jeszcze w trakcie realizacji pracy doktorskiej pod kierunkiem ówczesnego ordynatora Katedry Immunologii, Kliniki Pediatrii i Propedeutyki Wieku Rozwojowego Akademii Medycznej we Wrocławiu prof. dr hab. med. Adama Jankowskiego. Celem rozprawy była weryfikacja hipotezy o potencjalnie negatywnej roli *M. catarrhalis* w procesie alergizacji organizmu człowieka. U podłoża koncepcji i zakresu moich badań leżały bardzo nieliczne doniesienia, zgodnie z którymi 50% dzieci chorujących na nawracające lub chroniczne zapalenia oskrzeli może stanowić grupę ryzyka wystąpienia astmy oskrzelowej w późniejszym okresie życia [Gergen i wsp., 1992]. Znacznie więcej zwolenników miała wówczas hipoteza higieniczna, wskazująca na zupełnie odmienną - ochronną rolę bakterii przed tymi schorzeniami [Romagnani, 2004]. Właściwości immunogenne i proalergiczne bakteryjnych immunogenów testowałam zarówno w oparciu o antybakteryjną reaktywność pozyskanych surowic jak i w modelu *in vitro* transformacji blastycznej ludzkich jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC), poddawanych stymulacji antygenami frakcji błonowych oraz cytoplazmatycznych bakterii *M. catarrhalis*. W efekcie przeprowadzonych badań wykazałam, że stymulowane komórki PBMC dzieci chorych na nawracające zakażenia dróg oddechowych (RRTI) produkują znamienne mniej IFN- γ w porównaniu do komórek dzieci zdrowych i tych ze zdiagnozowaną astmą atopową oraz że 63% surowic tychże dzieci posiada swoiste przeciwciała IgE anty-*M. catarrhalis*. Wykazałam także, że odpowiedź proliferacyjna komórek PBMC dzieci z RRTI po stymulacji, zarówno błonowymi jak i

cytoplazmatycznymi antygenami *M. catarrhalis*, jest znacznie słabsza w porównaniu z grupą kontrolną oraz że nie jest to konsekwencja ilościowych różnic w populacjach limfocytów T i B pomiędzy badanymi grupami. Zaobserwowałam występowanie umiarkowanej negatywnej korelacji pomiędzy stężeniami anty-bakteryjnych surowiczych IgE i pochodowlanego IFN- γ . Otrzymane wyniki wskazywały, że u dzieci cierpiących na częste zakażenia dróg oddechowych, bez podłoża atopii, dochodzi do osłabienia odpowiedzi immunologicznej z udziałem PBMC, a w szczególności szlaku limfocytów Th-1. Przejawiało się to obniżoną produkcją IFN- γ oraz silniejszą odpowiedzią szlaku Th2, którego markerem była wzmożona obecność alergicznych antybakteryjnych przeciwciał IgE. Wyniki moich badań wykazały zatem czynnościowe osłabienie populacji Th1, sugerując że częste zakażenia mogą sprzyjać rozwojowi pro-alergicznego fenotypu [Augustyniak i wsp., 2003]. Wyniki te zaprezentowałam także w formie referatu na konferencji immunologicznej EFIS, the 14th European Immunology Meeting w 2000 roku, Poznań. Co ciekawe, wnioski płynące z tych badań zaczynają znajdować potwierdzenie obecnie. Są już dowody, że *M. catarrhalis* jako dominujący wraz z *H. influenzae* and *S. pneumoniae* gatunek bakterii zasiedlających drogi oddechowe pacjentów z ciężką astmą, ma związek z dłuższym czasem trwania choroby jak również z ostrzejszą niedrożnością dróg oddechowych [Green i wsp., 2014]. Również asymptomatyczna kolonizacja w/w bakteriami w okresie wczesnego dzieciństwa jest związana z wyższym ryzykiem rozwoju uporczywego świstu wydechowego oraz astmy [Bisgaard i wsp., 2007, Liu, 2015].

6.2. Po uzyskaniu stopnia doktora

Badania naukowe oraz projekty, w których brałam udział po uzyskaniu stopnia doktora, z wyłączeniem tych stanowiących kontynuację tematyki związanej bezpośrednio z obszarem moich zainteresowań, wynikały ze współpracy z innymi zespołami badawczymi i bazowały na mojej wiedzy oraz doświadczeniu w zakresie immunologii, mikrobiologii, biochemii i biologii komórki. W ramach tych projektów w kraju współpracowałam z: zespołem prof. dr hab. Stanisława Ułaszewskiego z Zakładu Genetyki naszego Instytutu, zespołem prof. dr hab. Bogusława Pawłowskiego z Katedry Biologii Człowieka naszego Wydziału, zespołem Zakładu Biotransformacji Wydziału Biotechnologii naszego Uniwersytetu oraz z zespołami prof. dr hab. med. Adama Jankowskiego i prof. dr hab. Iwony Kątnik-Prastowskiej z Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Od momentu powstania Zakładu Biologii Patogenów i Immunologii w 2010 roku, kierowanego przez moją obecną szefową prof. dr hab. Zuzannę Drulis-Kawę cały czas angażuję się także w tematykę badawczą dotyczącą bakteriofagów. W ramach współpracy międzynarodowej, do realizacji swoich celów pozyskałam dr S. McClean z University College Dublin, Irlandia, dr FT. Lundy z Queens University of Belfast, UK oraz dr. D. Smitha z Northumbria University, UK.

Badania dotyczyły tematyki z zakresu:

- [1] działania związków przeciwnowotworowych i przeciwmikrobowych
- [2] biologii patogenów, w tym bakteriofagów litycznych oraz bakterii gram-ujemnych
- [3] roli humoralnych biomarkerów w stanach patologicznych i fizjologicznych
- [4] zależności pomiędzy morfologicznymi i hormonalnymi miernikami kondycji biologicznej człowieka a funkcjonowaniem układu immunologicznego

6.2.1. Badania dotyczące działania związków przeciwnowotworowych i przeciwmikrobowych

Publikacje z tej tematyki:

- ✓ Majkowska-Skrobek G, **Augustyniak D**, Lis P, Bartkowiak A, Gonchar M, Ko YH, Pedersen PL, Goffeau A, Ułaszewski S. Killing multiple myeloma cells with the small molecule 3-bromopyruvate: implications for therapy. *Anti-cancer Drugs*, 2014, 25 (6): 673-82
- ✓ Niedźwiecka K, Dyląg M, **Augustyniak D**, Majkowska-Skrobek G, Cal-Bąkowska M, Ko YH, Pedersen PL, Goffeau A, Ułaszewski S. Glutathione may have implications in the design of 3-bromopyruvate treatment protocols for both fungal and algal infections as well as multiple myeloma. *Oncotarget*, 2016, 7 (40): 65614-65626
- ✓ Murzyn A, Krasowska A, **Augustyniak D**, Majkowska-Skrobek G, Łukaszewicz M, Dziadkowiec D. The effect of *Saccharomyces boulardii* on *Candida albicans*-infected human intestinal cell lines Caco-2 and Intestin 407. *FEMS Microbiology Letters*, 2010, 310(1): 17-23
- ✓ Dorotkiewicz-Jach A, **Augustyniak D**, Olszak T, Drulis-Kawa Z. Modern therapeutic approaches against *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Current Medicinal Chemistry*, 2015, 22 (14): 1642-1664

Niezmiernie interesujący nurt badań nad lekami przeciwnowotworowymi i przeciwgrzybiczymi, w których miałam przyjemność uczestniczyć, realizowałam we współpracy z zespołem prof. dr hab. Stanisława Ułaszewskiego. Badania dotyczyły 3-bromopirogronianu (3-BP) – związku o znikomej cytotoksyczności wobec komórek zdrowych, którego efekt terapeutyczny *in vitro* został udokumentowany wobec wielu nowotworów oddychających na drodze glikolizy w warunkach tlenowych [Ko i wsp., 2004, Pedersen, 2012]. Mechanizm działania 3-BP polega między innymi na hamowaniu kluczowych enzymów szlaku glikolitycznego, a mianowicie heksokinazy (HK₂) oraz dehydrogenaz: GAPDH i LDH [Shoshan, 2012]. Celem rażenia 3-BP jest wobec tego metabolizm energetyczny komórki. Moja praca, której wyniki zostały ujęte w publikacji *Majkowska-Skrobek i wsp., 2014*, polegała na przeprowadzeniu licznych testów biologicznych umożliwiających charakterystykę cytotoksycznego działania 3-BP wobec linii szpiczaka mnogiego RPMI 8226 w

porównaniu do izolowanych komórek jednojądrzastych PBMC. Jako kontrolę pozytywną stosowaliśmy preparat leczniczy Glivec (substancja czynna: imanitib), powszechnie stosowany w terapii tego nowotworu. W naszych badaniach, pokazaliśmy, że zależny od 3-BP efekt letalny komórek linii szpiczaka, wyrażony jako IC50, zachodzi już po 8 godzinach, natomiast po 24 godzinach jest on osiągany przy dwukrotnie niższym stężeniu związku w porównaniu do kontroli. Porównanie kinetyki pobierania znakowanego radioaktywnie 3-BP przez oba rodzaje komórek wykazało intensywniejszą akumulację związku w komórkach nowotworowych. Sugerowało to pokonywanie bariery błonowej przez 3-BP przy udziale aktywnego transportu działającego na zasadzie symportu, a opartego o transportery kwasów monokarboksylowych. Analiza ekspresji genów kodujących cztery transportery tzn. MCT1, MCT2, MCT3 i MCT4 w komórkach nowotworowych i zdrowych wykazała zwiększoną ekspresję MCT1 w komórkach szpiczaka, co potwierdzało rolę tej drogi we wnikanii związku do komórki. Intensywniejszemu poborowi 3-BP przez komórki nowotworowe towarzyszył też drastyczny spadek wewnątrzkomórkowego poziomu ATP, co wykazaliśmy metodą luminometryczną. Dostarczyliśmy w ten sposób dowodów, że 3-BP poprzez indukcję obniżenia wewnątrzkomórkowego poziomu ATP, zaburza swoisty profil metaboliczny komórek szpiczakowych, prowadząc do ich śmierci. Otrzymane wyniki pozwoliły nam stwierdzić, że 3-BP działa na komórki szpiczaka mnogiego w sposób specyficzny i selektywny, a jego efekt letalny jest silniejszy w porównaniu do Glivecu [Majkowska-Skobek i wsp., 2014].

W kolejnych badaniach [Niedźwiecka i wsp., 2016], podjęliśmy się dalszej charakterystyki zmian indukowanych przez 3-BP na poziomie komórkowym. Zauważyliśmy, że wydajność działania 3-BP ściśle zależy od wewnątrzkomórkowego stężenia glutationu, jako że (a) cytotoksyczny efekt wywierany przez 3-BP był wyraźnie wzmocniony w obecności BSO (*buthionine sulfoximine*) – związku redukującego stężenie tego enzymu, (b) poziom glutationu w komórkach szpiczaka obniżał się w obecności 3-BP. Pokazaliśmy także, że w trakcie hodowli 3-BP wzrasta w komórkach szpiczaka generowanie reaktywnych form tlenu co przyczynia się do indukcji procesu apoptozy. Udowodniliśmy zatem, że 3-BP zabija komórki szpiczakowe również poprzez obniżenie poziomu glutationu, konsekwencją czego jest silna indukcja stresu oksydacyjnego. Równolegle prowadzone prace w innych ośrodkach naukowych wykazały, że komórki nowotworowe cechujące się wysokim poziomem glutationu, są efektywnie zabezpieczone przed działaniem reaktywnych form tlenu (ROS), co hamuje tym samym ich apoptozę [Feng i wsp., 2014].

Kontynuacją naszych badań prowadzonych na modelu nowotworowej linii szpiczaka były doświadczenia z wykorzystaniem patogennych grzybów z rodzaju *Cryptococcus* i mikro-alg z rodzaju *Prototheca* [Niedźwiecka i wsp., 2016]. Wykazaliśmy w nich korelację pomiędzy naturalnym wewnątrzkomórkowym stężeniem glutationu, a wrażliwością na 3-BP. Jak udokumentowaliśmy eksperymentalnie, im niższe było stężenie glutationu, tym większą

podatnością na cytotoksyczne działanie 3-BP cechowały się badane mikroorganizmy. Sam 3-BP również znacząco obniżał stężenie glutationu w komórce. Tu także, podobnie do doświadczeń na linii szpiczakowej, zaobserwowaliśmy wysoce synergistyczne bójcze działanie 3-BP i BSO. Udokumentowaliśmy tym samym, że 3-BP jawi się jako obiecujący i skuteczny lek przeciwnowotworowy, cechując się dużą toksycznością w niskich dawkach.

Publikacja **Murzyn et al., 2010** jest efektem mojej współpracy z Zakładem Biotransformacji Wydziału Biotechnologii UW. Wykorzystując moje doświadczenie w technikach hodowli tkankowych wykazaliśmy w niej, że probiotyczny szczep drożdży *Saccharomyces boulardii* oraz jego pochodzony ekstrakt hamuje adhezję patogennego drożdżaka *Candida albicans* do dwóch ludzkich linii nabłonkowych, w tym nabłonka Intestin 407 oraz nabłonka okrężnicy Caco-2. Ponieważ już wówczas wiadano, że u *C. albicans* morfologiczna transformacja (tranzycja) komórek drożdży w strzępki, a następnie ich wzrost jest skorelowany z wirulencją i inwazyjnością [Villar i wsp., 2004], nasze dalsze eksperymenty służyły zbadaniu wpływu ekstraktu *S. boulardii* na proces morfogenezy grzyba. W ich wyniku pokazaliśmy, że ekstrakt redukuje proces filamentacji i tworzenie strzępek tego oportunistycznego patogenu. Następnie, w oparciu o metody RT-PCR zaobserwowaliśmy, że w komórkach Caco-2 zakażonych *C. albicans* i hodowanych w obecności probiotycznego ekstraktu, dochodzi do redukcji ekspresji prozapalnej cytokiny i kluczowego chemoatraktanta neutrofilów - IL-8. W naszych badaniach nad działaniem ekstraktu *S. boulardii* wobec *C. albicans* w warunkach zakażenia *in vitro* poza anty-adhezyjnym i anty-wirulentnym pokazaliśmy także jego przeciwzapalny potencjał.

Kontynuacja tych badań przez Zakład Biotransformacji doprowadziła do identyfikacji kwasu kaprynowego, jako głównego przeciwnowotworowego związku aktywnego wobec *C. albicans*, produkowanego przez *S. boulardii* [Murzyn i wsp., 2010].

Moje zainteresowania tematyką związków przeciwnowotworowych mają swoje odzwierciedlenie także w pracy przeglądowej autorstwa **Dorotkiewicz-Jach i wsp., 2015**, dotyczącej nowoczesnych i obiecujących metod terapeutycznych i ich zastosowań w terapii zakażeń ze strony *Pseudomonas aeruginosa* – wiodącego patogenu zakażeń szpitalnych związanych z dużą śmiertelnością oraz mukowiscydozy. Opisaliśmy w niej zarówno te obecnie stosowane (antybiotyki, nanocząsteczki, inhibitory *quorum-sensing*, immunoterapia) jak i alternatywne (bakteriofagi, terapia fotodynamiczna) formy terapii. Zagadnieniami opracowanymi przez mnie były te dotyczące terapii opartej na immunizacji aktywnej (szczepionki) bądź pasywnej (przeciwciała monoklonalne) oraz na peptydach przeciwnowotworowych. Obraz, który się wyłonił po przeglądzie literatury wyraźnie wskazuje, iż pomimo postępu w strategiach terapeutycznych używanych do zwalczania tego

wielolekoopornego, oportunistycznego patogenu, wciąż nie ma „złotego środka” który poradziłby sobie z jego narastającą opornością.

6.2.2. Badania dotyczące biologii patogenów, w tym bakteriofagów litycznych oraz bakterii gram-ujemnych

Publikacje z tej tematyki:

- ✓ Danis-Włodarczyk K, Olszak T, Arabski M, Wąsik S, Majkowska-Skrobek G, **Augustyniak D**, Guła G, Briers Y, Bin Jang H, Vandenheuvel D, Duda KA, Lavigne R, Drulis-Kawa Z. Characterization of the newly isolated lytic bacteriophages KTN6 and KT28 and their efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. PLoS One 2015, 10 (5): e0127603
- ✓ Olszak T, Zarnowiec P, Kaca W, Danis-Włodarczyk K, **Augustyniak D**, Drevinek P, de Soyza A, McClean S, Drulis-Kawa Z. In vitro and in vivo antibacterial activity of environmental bacteriophages against *Pseudomonas aeruginosa* strains from cystic fibrosis patients. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99 (14): 6021-6033
- ✓ Kęsik-Szeloch A, Drulis-Kawa Z, Weber-Dąbrowska B, Kassner J, Majkowska-Skrobek G, **Augustyniak D**, Lusiak-Szelachowska M, Zaczek M, Górski A, Kropinski AM. Characterising the biology of novel lytic bacteriophages infecting multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae*. Virology Journal, 2013, 10: 100
- ✓ Drulis-Kawa Z, Mackiewicz P, Kęsik-Szeloch A, Maciaszczyk-Dziubinska E, Weber-Dąbrowska B, Dorotkiewicz-Jach A, **Augustyniak D**, Majkowska-Skrobek G, Bocier T, Empel J, Kropinski AM. Isolation and characterisation of KP34--a novel ϕ KMV-like bacteriophage for *Klebsiella pneumoniae*. Applied Microbiology and Biotechnology 2011, 40 (4): 1333-1345
- ✓ Krasowska A, Biegalska A, **Augustyniak D**, Łoś M, Richert M, Łukaszewicz M. Isolation and characterization of phages infecting *Bacillus subtilis*. BioMed Research International, 2015, 2015: 179597
- ✓ Cullen L, Weiser R, Olszak T, Maldonado RF, Moreira AS, Slachmuylders L, Brackman G, Paunova-Krasteva TS, Zarnowiec P, Czerwonka G, Reilly J, Drevinek P, Kaca W, Melter O, de Soyza A, Perry A, Winstanley C, Stoitsova SR, Lavigne R, Mahenthiralingam E, Sá-Correia I, Coenye T, Drulis-Kawa Z, **Augustyniak D**, Valvano MA, McClean S. Phenotypic characterisation of an international *Pseudomonas aeruginosa* reference panel: Strains of cystic fibrosis origin show less in vivo virulence than non-CF strains. Microbiology-SGM, 2015, 161: 1961-1977

Kolejny nurt badań, w których od paru lat biorę czynny udział to temat badawczy mojego kierownika, prof. dr hab. Zuzanny Drulis-Kawy. Główny aspekt dotyczy biologii bakteriofagów

litycznych specyficznych wobec wielololekoopornych bakterii gram-ujemnych. Terapia fagowa oparta zarówno na całych cząstkach fagowych jak i kodowanych przez fagi białkach/enzymach jest teoretycznie uznawana za alternatywną do zwalczania bakterii opornych na antybiotyki [Drulis-Kawa i wsp., 2012]. Dotychczas naszemu zespołowi kierowanemu przez prof. Drulis-Kawę udało się wyizolować kilkadziesiąt fagów litycznych wobec wiodących patogennych bakterii z gatunków *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* czy *Burkholderia cepacia complex*. Część tych fagów została zsekwencjonowana i scharakteryzowana pod względem genetycznym, biochemicznym oraz biologicznym. Moja współpraca w tematyce fagów specyficznych wobec *P. aeruginosa* zaowocowała zarówno aktywnym udziałem jako wykonawca w projekcie NCN HARMONIA 2012/04/M/NZ6/00335; 2012-2016 oraz dwiema publikacjami [Olszak i wsp., 2015; Danis-Włodarczyk i wsp., 2015]. Nadrzędnym celem projektu było otrzymanie i charakterystyka rekombinowanej depolimerazy egozpolisacharydu kodowanej przez fagi *P. aeruginosa*, natomiast początkowym etapem jego realizacji była szczegółowa charakterystyka nowo wyizolowanych fagów cechujących się najsilniejszą aktywnością lityczną oraz szerokim spektrum gospodarzy. Specyficzność dwóch z nich, a mianowicie fagów KT28, KTN6, poprzez analizę receptorów fagowych gospodarza, została określona z wykorzystaniem szeregu mutantów *P. aeruginosa* PAO1. Wykazała ona, że receptorem obydwu fagów jest LPS. Rola LPS w oddziaływaniach z tymi fagami została następnie potwierdzona w doświadczeniach neutralizacji z moim udziałem, w których pokazaliśmy że wraz ze wzrostem stężenia LPS dochodzi do zahamowania infekcyjności cząstek fagowych. Interakcje wspomnianych fagów z LPS potwierdziłam także w testach efektywnego wiązania LPS przez biotynylowane fagi z użyciem opracowanej przeze mnie metody immunoenzymatycznej. Następnie pokazaliśmy, że fagi KT28 i KTN6 rozpoznające LPS redukują ilość bakterii występujących w biofilmie oraz hamują ich zdolność do produkcji czynników wirulencji takich jak plicyjanina i piowerdyna. Mogą zatem być rozpatrywane jako alternatywne czynniki przeciwbakteryjne i anty-wirulentne wobec pałeczek *P.aeruginosa* [Danis-Włodarczyk i wsp., 2015]. Równolegle poszukiwaliśmy zależności pomiędzy wrażliwością *P. aeruginosa* na fagi, a właściwościami fenotypowymi bakterii, włączając w te badania izolaty pochodzące od pacjentów z mukowiscydozą. Analizując mukoidalność, zdolność do produkcji pili typu IV, tworzenie biofilmu, fluktuacje składu biochemicznego przy pomocy spektroskopii ATR-FTIR oraz model infekcyjny *Galleria melonela* pokazaliśmy, że niemukoidalne szczepy *P. aeruginosa* cechujące się szybkim tempem wzrostu, klonalnie homogenne oraz nie produkujące intensywnie biofilmu są najbardziej podatne na infekcje bakteriofagową w warunkach *in vitro* i *in vivo* [Olszak i wsp., 2015].

Brałam także udział w badaniach kierowanych przez prof. Drulis-Kawę, nad biologią bakteriofagów litycznych wobec *Klebsiella pneumoniae*. Efektem naszej współpracy są dwie publikacje: Drulis-Kawa i wsp., 2011 i Kęsik-Szeloch i wsp., 2013. W badaniach ocenialiśmy zakres

lityczny fagów wobec dużej puli gospodarzy, wpływ czynników fizykochemicznych na fagi i dynamikę propagacji fagów. Wyniki naszych badań pokazywały, że bakteriofagi *Klebsiella pneumoniae* o węższym spektrum aktywności litycznej namnażają się wydajniej i szybciej aniżeli te, u których to spektrum jest szersze. Z kolei z analiz restrykcyjnych DNA fagowego wynikało, że fagi charakteryzujące się opornością na użyte enzymy restrykcyjne kodują metylotransferazy Dam i Dcm.

W ramach tematyki fagowej miałam przyjemność uczestniczyć także w pracach zespołu kierowanego przez dr. hab. Marcina Łukaszewicza i dr hab. Annę Krasowską, które zaowocowały publikacją **Krasowska i wsp., 2015**. W tym przypadku pracowaliśmy z fagami litycznymi wobec bakterii gram-dodatniej *Bacillus subtilis*. Przedmiotem badań były cztery nowo-wyizolowane bakteriofagi: SIOΦ, SUBω i SPOσ z rodziny *Myoviridae* oraz Arπ - przedstawiciel rodziny *Siphoviridae*. Nasze badania umożliwiły charakterystykę biologii wymienionych bakteriofagów poprzez określenie: morfologii, wielkości genomów, profilu białek strukturalnych, specyficzności wobec gospodarzy oraz podatności na czynniki fizykochemiczne (temperatura, pH). Moja rola w ramach wspomnianej współpracy polegała na opracowaniu i wykonywaniu doświadczeń umożliwiających genetyczną i biochemiczną charakterystykę cząstek fagowych odpowiednio poprzez analizę całych genomów fagowych metodą elektroforezy pulsacyjnej PFGE oraz izolację i analizę strukturalnych białek fagowych. Badania nasze, mogą stanowić zaczyn do dalszych badań nad potencjalnym zastosowaniem scharakteryzowanych bakteriofagów i są istotne jeśli uwzględni się szkody, jakie te wysoce odporne na czynniki fizykochemiczne bakterie, powodują w przemyśle spożywczym.

Z inicjatywy prof. dr hab. Z. Drulis-Kawy wzięłam także udział w europejskim projekcie COST BM1003 „Microbial cell surface determinants of virulence as targets for new therapeutics in Cystic Fibrosis” 2011-2014. W ramach grupy roboczej WG1 tego projektu (Załącznik nr 7) , złożonej z kilkudziesięciu naukowców przeprowadziliśmy fenotypową charakterystykę 43 szczepów *P. aeruginosa*, które pochodziły od pacjentów z mukowiscydozą (CF) bądź były izolowane z innych schorzeń (non-CF). Efekty naszej współpracy zaowocowały publikacją **Cullen i wsp., 2015**. Analiza dotyczyła zbadania różnic pomiędzy szczepami we wzroście, ruchliwości, wrażliwości na antybiotyki i bakteriofagi, profilu LPS, fenotypie mukoidalnym, a także ich zdolności do produkcji cząsteczek sygnalizacyjnych laktonu N-acylo-L-homoseryny (AHL), piocyjaniny, alginatu, ureazy oraz tworzenia biofilmu. Oceniana była także wirulencja szczepów w modelu *Galleria melonela in vivo*. Mój udział w tym projekcie dotyczył określenia zdolności szczepów do produkcji piocyjaniny oraz identyfikację szczepów auksotroficznych pod względem wymagań aminokwasowych. Wnioski płynące z naszych badań wskazywały, że szczepy CF cechowały się słabszą wirulencją *in vivo* w

porównaniu do szczepów non-CF. Nie zaobserwowaliśmy natomiast wyraźnych różnic fenotypowych porównując te dwie wyodrębnione grupy. Dzięki naszej współpracy utworzony został międzynarodowy panel referencyjny szczepów *P. aeruginosa*, opisany po raz pierwszy w 2013 roku [De Soyza i wsp., 2013]. Panel obejmujący szczepy w pełni scharakteryzowane fenotypowo oraz zdefiniowane, pochodzące z różnych materiałów klinicznych i miejsc geograficznych, odzwierciedla ogromne zróżnicowanie tego gatunku i stanowi cenne źródło informacji dla naukowców badających patogenезę chorób z udziałem pałeczki ropy błękitnej.

6.2.3. Badania nad rolą humoralnych biomarkerów w stanach patologicznych i fizjologicznych

Publikacje z tej tematyki:

- ✓ Polańska B, **Augustyniak D**, Makulska I, Niemczuk M, Zwolińska D, Jankowski A. Elastase, α 1-proteinase inhibitor, and interleukin-8 in pre-dialyzed and hemodialyzed patients with chronic kidney disease. *Pediatrics International*, 2010, 52 (5): 735-43
- ✓ Polańska B, **Augustyniak D**, Makulska I, Niemczuk M, Jankowski A, Zwolińska D. Elastase, α 1-proteinase inhibitor, and interleukin-8 in children and young adults with end-stage kidney disease undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis*, 2014, 62 (3): 239-45
- ✓ Polańska B, Makulska I, **Augustyniak D**, Niemczuk M, Zwolińska D, Jankowski A. Serum levels of MMP-9 in children and young adults with chronic kidney disease treated conservatively and undergoing hemodialysis. *Central European Journal of Immunology*, 2007, 32(2): 66-71
- ✓ Polańska B, Niemczuk M, Augustyniak D, Jankowski A. Plasma neutrophil elastase in children with recurrent aphthous stomatitis. *Central European Journal of Immunology*, 2006, 31 (1-2): 15-17
- ✓ Orczyk-Pawitowicz M, **Augustyniak D**, Hirnle L, Kątnik-Prastowska I. Degree of sialylation and fucosylation of plasma and amniotic immunoglobulin G changes progressively during normal pregnancy. *Prenatal Diagnosis*, 2012, 32 (5): 432-9
- ✓ Orczyk-Pawitowicz M, **Augustyniak D**, Hirnle L, Kątnik-Prastowska I. Lectin-based analysis of fucose and sialic acid expressions on human amniotic IgA during normal pregnancy. *Glycoconjugate Journal*, 2013, 30: 599-608

Moje zainteresowania tematyką badań klinicznych, były konsekwencją wieloletniej współpracy z zespołem lekarskim mojego poprzedniego szefa prof. dr hab. Adama Jankowskiego z III Katedry i Kliniki Pediatrii, Immunologii i Reumatologii Wieku Rozwojowego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, a w szczególności z dr Bożeną Polańską. Wyszczególnione prace: **Polańska i wsp., 2010**,

Polańska i wsp., 2014, Polańska i wsp., 2007 zawierają wyniki naszych badań nad rolą neutrofilów w przebiegu przewlekłej niewydolności nerek u dzieci i dorosłych, poddawanych różnym formom dializoterapii oraz leczonych konserwatywnie. Koncentrowaliśmy się na poszukiwaniu biomarkerów zapalenia neutrofilowego, a w szczególności na poszukiwaniu współzależności pomiędzy nimi w odniesieniu do stosowanej terapii nerkozastępczej. Do badań wybraliśmy: enzym proteolityczny – elastazę neutrofilową (NE), jej fizjologiczny inhibitor α 1PI, główny chemoatraktant neutrofilów – IL-8 oraz odpowiedzialną za degradację macierzy zewnątrzkomórkowej metaloproteinaza MMP-9. W oparciu o przeprowadzone przeze mnie analizy statystyczne danych ilościowych wymienionych markerów wykazaliśmy, że u pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek poddawanych regularnej hemodializie, dializie dootrzewnowej oraz tych będących w okresie przeddializacyjnym i leczonych konserwatywnie, dochodzi do znamiennej wzmożonej aktywacji neutrofili, odzwierciedlonej poprzez wzrost cyrkulującego kompleksu NE- α 1PI (elastaza występująca w kompleksie z inhibitorem). Sugerowało to, że znacząco podwyższony wzrost NE- α 1PI w krwiobiegu nie zależy od formy dializoterapii (hemodializa versus dializa dootrzewnowa). Wykazaliśmy także, że pojedyncza sesja hemodializacyjna zwiększa stężenie kompleksu NE- α 1PI w krążeniu oraz że wzrost ten jest pozytywnie skorelowany z wolnym inhibitorem α 1PI. W odróżnieniu od NE- α 1PI, cyrkulujące stężenie pozostałych mediatorów zapalenia, a mianowicie α 1PI, IL8 i MMP-9 nie odbiegało od wartości normatywnych w żadnej z 3 grup pacjentów. Również pojedyncza sesja hemodializacyjna nie powodowała ich zmian ilościowych. Ponadto, w przypadku hemodializy, zaobserwowaliśmy brak wpływu rodzaju stosowanej membrany dializacyjnej (kuprofanowa versus polisulfonowa) oraz typu użytej podczas zabiegu heparyny (drobnocząsteczkowa versus wielkocząsteczkowa) na obserwowane zjawisko. Podsumowując, stwierdziliśmy że u dzieci oraz dorosłych z przewlekłą niewydolnością nerek, poddawanych różnym formom dializoterapii bądź leczonych konserwatywnie, NE- α 1PI wydaje się być znacznie lepszym biomarkerem stanu zapalnego niż wolny inhibitor α 1PI, IL-8 czy MMP-9. Wykazaliśmy także, że pojedyncza sesja hemodializacyjna przyczynia się do zaostrzenia stanu zapalnego [Polańska et al., 2010, Polańska et al., 2014, Polańska et al., 2007].

Podobne wnioski na temat roli kompleksu NE- α 1PI jako przydatnego biomarkera w monitorowaniu stanu zapalnego, uzyskaliśmy na podstawie badań klinicznych przeprowadzonych u dzieci z nawrotowym aftowym zapaleniem jamy ustnej [Polańska i wsp., 2006].

Współpraca z zespołem badawczym prof. dr hab. Iwony Kątnik-Prastowskiej z Katedry Chemii i Immunochemii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, szczególnie zaś z dr hab. Magdaleną Orczyk-Pawiłowicz zaowocowała dwiema publikacjami podejmującymi problematykę zmian profilu glikozylacji immunoglobulin płynu owodniowego w zależności od stopnia zaawansowania ciąży [Orczyk-Pawiłowicz i wsp., 2012, Orczyk-Pawiłowicz i wsp., 2013]. Badania skupiały się na ocenie

względnej zawartości sialowanych i fukozylowanych glikotopów, występujących na immunoglobulinach IgG i IgA i wpisywały się w obszar dotyczący poszukiwań wzajemnych zależności pomiędzy glikomarkerami płynu owodniowego a dojrzałością płodu [Orczyk-Pawłowicz i Kątnik-Prastowska, 2011]. Glikotopy zawierające kwas sialowy przyłączony wiązaniami glikozydowymi α 2,3- i α 2,6- oraz/lub fukozę α 1,2-, α 1,3- i α 1,6- stanowią element „kodu cukrowego” istotnego w procesach przekazywania informacji między komórkami. Ich obecność na immunoglobulinach klasy G płynu owodniowego, odmienna niż dla IgG osocza matki, poprzez wpływ na powinowactwo wiązania z antygenem czy z receptorami Fc γ R, determinuje funkcje obronne przeciwciał modulując np. fagocytozę czy aktywację dopełniacza [Anthony i Ninmerjahn, 2011, Gabius, 2017]. Uzyskane przez nas wyniki wskazują, że profil glikozylacji owodniowych IgG oraz IgA ulega dynamicznym zmianom w zależności od stopnia zaawansowania ciąży, cechując się wzmożoną ekspresją określonych sialoglikotopów oraz fukozyloglikotopów na przełomie II i III trymestru ciąży. Ponadto obie klasy owodniowych immunoglobulin charakteryzują się zmianami zarówno jakościowymi jak i ilościowymi tj. wzmożoną ekspresją sialo- oraz fukozyloglikotopów w porównaniu do form z osocza. Podsumowując wykazane zmiany w profilu sializacji oraz fukozytacji kluczowych immunoglobulin odpowiedzi wtórnej wraz ze zmianami jakościowymi w strukturze glikotopów stanowią odzwierciedlenie istotnej roli glikozylacji w trakcie prawidłowego przebiegu ciąży oraz ochrony płodu.

Efektom mojej współpracy z prof. dr hab. Iwoną Kątnik-Prastowską było także współautorstwo kilku rozdziałów w podręczniku akademickim pod jej redakcją naukową, zatytułowanym „Immunochemia w biologii medycznej. Metody laboratoryjne” wydanym przez PWN i kierowanym do studentów wyższych uczelni o profilu biologicznym oraz medycznym.

6.2.4. Badania dotyczące zależności pomiędzy morfologicznymi i hormonalnymi miernikami kondycji biologicznej człowieka a funkcjonowaniem układu immunologicznego

Publikacje z tej tematyki:

- ✓ Pawłowski B, Nowak J, Borkowska B, **Augustyniak D**, Drulis-Kawa Z. Body height and immune efficacy: testing body stature as a signal of biological quality No evidence for the immunocompetence handicap hypothesis in male humans. Proceedings of the Royal Society B – Biological Sciences, 2017, 284 (1859): 20171372
- ✓ Nowak J, Pawłowski B, Borkowska B, **Augustyniak D**, Drulis-Kawa Z. No evidence for the immunocompetence handicap hypothesis in male humans. Scientific Reports, 2018, 8 (1): 7392

- ✓ Pawłowski B, Borkowska B, Nowak J, **Augustyniak D**, Drulis-Kawa Z. Human body symmetry and immune efficacy in healthy adults. *American Journal of Physical Anthropology*, 2018, 167 (2): 207-2016

Kilka lat temu podjęłam współpracę ze znanym polskim antropologiem/biologiem behawioralnym Prof. dr hab. Bogusławem Pawłowskim, w ramach wspólnego nowatorskiego grantu: „Morfologiczne i hormonalne mierniki kondycji biologicznej a jakość układu immunologicznego.” NCN 2012/07/B/NZ8/02666, OPUS 4 (2013-2017), którego był on kierownikiem i inicjatorem. Wraz z dwoma doktorantkami, Judytą Nowak (obecnie dr) której byłam promotorem pomocniczym oraz Barbarą Borkowską (obecnie dr), przy współpracy Prof. Zuzanny Drulis-Kawy, poszukiwaliśmy związków pomiędzy różnymi cechami morfologicznymi powszechnie uwzględnianymi w doborze płciowym (budowa ciała, wysokość ciała, asymetria fluktuacyjna ciała i twarzy itp.), a kondycją biologiczną człowieka definiowaną w naszym projekcie jako szeroko pojęta kondycja immunologiczna. Innymi słowy weryfikowaliśmy założenia powszechnie obowiązujących hipotez o sygnalizacyjnej roli fizycznej atrakcyjności, w tym hipotezy upośledzenia immunologicznego (ICHH, *immunocompetence handicap hypothesis*) mówiącej, że im atrakcyjniejsze dla partnera cechy morfologiczne tym niższa jakość biologiczna - bardziej upośledzony system odpornościowy. Będąc twórcą koncepcji badań immunologicznych we wspomnianym projekcie, moja rola polegała na zaplanowaniu i opracowaniu całego panelu metod, na podstawie których bylibyśmy w stanie wielopłaszczyznowo ocenić funkcjonowanie układu immunologicznego. W całym projekcie, do oceny ramienia odpowiedzi nieswoistej humoralnej wybrałam działanie układu dopełniacza (test 50% hemolizy) oraz lizozymu (metoda turbidymetryczna z *Micrococcus luteus*), natomiast z ramienia odpowiedzi nieswoistej komórkowej efektywność fagocytozy i wybuch tlenowy, które były mierzone odpowiednio przy wykorzystaniu FACS-u i chemiluminometru. W odniesieniu do odpowiedzi swoistej, badanymi parametrami odporności humoralnej była indukcja przeciwciał poszczepiennych w następstwie szczepienia na grypę i/lub tężec (testy ELISA), natomiast odporności komórkowej, odpowiedź proliferacyjna komórek jednojądrzastych PBMC stymulowanych mitogenami (test proliferacji blastycznej, pomiar na liczniku scyntylacyjnym). Wyniki naszych badań przeprowadzonych na grupie kilkudziesięciu zdrowych wolontariuszy obydwu płci oparte na różnych modelach regresji, pokazały, że nie istnieje związek pomiędzy żadnym z analizowanych parametrów immunologicznych a wysokością czy stopniem symetrii ciała [Pawłowski i wsp., 2017, Pawłowski i wsp., 2018]. Taki rezultat może sugerować, że ani wzrost ani symetria ciała nie jawi się jako istotny miernik morfologiczny związany z odpornością ustroju. Zaproponowana została (przez Prof. Pawłowskiego) zatem nowa hipoteza nazwana Hipotezą Priorytetów Immunologicznych (*Immunity Priority Hypothesis*), która bazując na

hipotezie ograniczonych zasobów energii próbuje wyjaśnić brak obserwowanych zależności. Zakłada ona, że inwestycja w tzw. „atrakcyjność” nie może odbywać się kosztem układu immunologicznego i jest ona możliwa dopiero po zaspokojeniu jego potrzeb energetycznych, niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania. Założenia hipotezy ICHH weryfikowaliśmy także poprzez analizę zależności pomiędzy androgenami a wydajnością immunologiczną [Nowak i wsp., 2018]. Wedle obecnej definicji, jedynie osobniki o wysokiej jakości biologicznej i postrzegane jako te, które mogą zapewnić lepszy sukces reprodukcyjny, mogą utrzymywać w organizmie wysoki poziom testosteronu i pozwolić sobie na koszty fizjologiczne zależnej od niego immunosupresji. Wyniki naszych nowatorskich badań przeprowadzonych na grupie szczepionych na grypę mężczyzn nie potwierdziły immunosupresyjnego działania androgenów. Nie wykazaliśmy zatem, że bardziej „męscy” mężczyźni o wysokim poziomie testosteronu cechują się słabszą wydajnością zarówno wrodzonej jak i nabytej odpowiedzi immunologicznej i *vice versa*. Wyniki naszych badań wykazały raczej immunomodulującą aniżeli immunosupresyjną rolę androgenów w odniesieniu do efektywnej odpowiedzi nabytej, wedle której to właśnie mężczyźni z wyższym stężeniem wolnego testosteronu jak i dihydrotestosteronu posiadają wyższą jakość biologiczną wyrażaną silniejszą odpowiedzią poszczepienną na grypę. Nasze pionierskie badania miały kluczowy wpływ na weryfikację ewolucyjnych hipotez o biologicznym znaczeniu cech fizycznej atrakcyjności u człowieka i jako pierwsze wykorzystywały do oceny kondycji biologicznej bezpośrednie parametry funkcjonowania układu odpornościowego.

7. Piśmiennictwo

1. Anthony RM, Nimmerjahn F. The role of differential IgG glycosylation in the interaction of antibodies with FcγRs in vivo. *Curr Opin Organ Transplant.*, 2011, 16: 7-14
2. Attia AS, Ram S, Rice PA, Hansen EJ. Binding of vitronectin by the *Moraxella catarrhalis* UspA2 protein interferes with late stages of the complement cascade. *Infect Immun.*, 2006,74: 1597–611
3. Augustyniak D, Majkowska-Skrobek G, Kraus-Filarska M, Jankowski A. Effects of *Moraxella catarrhalis* antigens on IFN-γ, IL-4 and IL-13 production by PBMC from children with atopic asthma or recurrent respiratory tract infections. *Centr Eur J Immunol.*, 2003, 28 (1): 6-13
4. Bisgaard H, Hermansen MN, Buchvald F, Loland L, Halkjaer LB, Bonnelykke K, et al. Childhood asthma after bacterial colonization of the airway in neonates. *N Engl J Med.*, 2007, 357: 1487–95
5. Borghans JA, Noest AJ, De Boer RJ. How Specific Should Immunological Memory Be? *J Immunol.*, 1999, 163: 569-575
6. Brogden KA, Guthmiller JM, Salzberg M, Zasloff M. The nervous system and innate immunity: the neuropeptide connection. *Nat Immunol.*, 2005, 6(6): 558-564
7. Broides A, Dagan R, Greenberg D, Givon-Lavi N, Leibovitz E. Acute otitis media caused by *Moraxella catarrhalis*: epidemiologic and clinical characteristics. *Clin Infect Dis.*, 2009, 49(11): 1641-1647
8. Brooks M, Sedillo JL, Wagner N, Laurence CA, Wang W, Attia AS, Hansen EJ, et al. Modular arrangement of allelic variants explains the divergence in *Moraxella catarrhalis* UspA protein function. *Infect Immun.*, 2008, 76(11): 5330-5340

9. Dang XY, Li J, Liu C, Fu Y, Zhou F, Tang L, et al. CGRP attenuates hyperoxia-induced oxidative stress-related injury to alveolar epithelial type II cells via the activation of the Sonic hedgehog pathway. *Int J Mol Med.*, 2017, 40(1): 209-216
10. De Jonge MI, Vidarsson G, van Dijken HH, Hoogerhout P, van Alphen L, Dankert J, van der Ley P. Functional activity of antibodies against the recombinant OpaJ protein from *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun.*, 2003, 71(5): 2331-2340
11. De Soyza A, Hall AJ, Mahenthiralingam E, Drevinek P, Kaca W, Drulis-Kawa Z, Stoitsova SR, Toth V, Coenye T, Zlosnik JE, Burns JL, Sá-Correia I, De Vos D, Pirnay JP, Kidd TJ, Reid D, Manos J, Klockgether J, Wiehlmann L, Tümmler B, McClean S, Winstanley C; EU FP7 funded COST Action BM1003 "Cell surface virulence determinants of cystic fibrosis pathogens". Developing an international *Pseudomonas aeruginosa* reference panel. *Microbiologyopen*, 2013, 2(6): 1010-23
12. Drulis-Kawa Z, Majkowska-Skrobek G, Maciejewska B, Delattre AS, Lavigne R. Learning from bacteriophages - advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications. *Curr Protein Pept Sci.* 2012, 13(8): 699-722
13. El-Benna J, Hurtado-Nedelec M, Marzaoli V, Marie JC, Gougerot-Pocidal MA, Dang PM. Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. *Immunol Rev.*, 2016, 273(1):180-93
14. Endeman H, Cornips MCA, Grutters JC, van den Bosch JM, Ruven HJT, van Velzen-Blad H, Rijkers GT, Biesma DH. The Fcγ receptor IIA-R/R131 genotype is associated with severe sepsis in community-acquired pneumonia. *Clin Vaccine Immunol.*, 2009, 16 (7): 1087-1090
15. Fairlie-Clarke K J, Shuker DM, Graham AL. Why Do Adaptive Immune Responses Cross-React? *Evol Appl.*, 2009, 2 (1): 122-131
16. Feng X, Zhang Y, Wang P, Liu Q, Wang X. Energy metabolism targeted drugs synergize with photodynamic therapy to potentiate breast cancer cell death. *Photochem Photobiol Sci.*, 2014, 13(12): 1793-1803
17. Gabius HJ. The sugar code: Why glycans are so important. *Biosystems*, 2018, 164: 102-111
18. Gergen PJ, Terkeltaub PC, Kramer RA. Age of onset in childhood asthma: data from national cohort. *Ann Allergy*, 2012, 68: 507-14
19. Green BJ, Wiriyaichai P, Grainge C, Rogers GB, Kehagia V, Lau L, Carroll MP, Bruce KD, Howarth PH. Potentially pathogenic airway bacteria and neutrophilic inflammation in treatment resistant severe asthma. *PLoS One*, 2014, 9(6): e100645
20. Gunti S, Notkins AL. Polyreactive Antibodies: Function and Quantification. *J Infect Dis.*, 2015, 212 Suppl 1: S42-6
21. Hallström T, Nordsström T, Tan TT, Manolov T, Lambris JD, Isenman DE, Zipfel PF, Blom AM, Riesbeck K. Immune evasion of *Moraxella catarrhalis* involves ubiquitous surface protein A-dependent C3d binding. *J Immunol.*, 2011, 186(5): 3120-9
22. Hallström T, Uhde M, Singh B, Skerka Ch, Riesbeck K, Zipfel PF. *Pseudomonas aeruginosa* uses dihydrolipoamide dehydrogenase (Lpd) to bind to the human terminal pathway regulators vitronectin and clusterin to inhibit terminal pathway complement attack. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0137630
23. Heiniger N, Spaniol V, Troller R, Vischer M, Aebi C. A reservoir of *Moraxella catarrhalis* in human pharyngeal lymphoid tissue. *J Infect Dis.*, 2007, 196: 1080-7
24. Higel F, Seidl A, Sörgel F, Friess W. N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc fusion proteins. *Eur J Pharm Biopharm.*, 2016, 100: 94-100
25. Holm MM, Vanlerberg SL, Foley IM, Sledjeski DD, Lafontaine ER. The *Moraxella catarrhalis* porin-like outer membrane protein CD is an adhesin for human lung cells. *Infect Immun.*, 2004, 72(4): 1906-13
26. Holzmann B. Antiinflammatory activities of CGRP modulating innate immune responses in health and disease. *Curr Protein Pept Sci.*, 2013: 14(4): 268-74
27. James LC, Tawfik DS. The specificity of cross-reactivity: promiscuous antibody binding involves specific hydrogen bonds rather than nonspecific hydrophobic stickiness. *Protein Sci.*, 2003, 12(10): 2183-2193
28. Ko YH, Smith BL, Wang Y, Pomper MG, Rini DA, Torbenson MS, Hullihen J, Pedersen PL. Advanced cancers: eradication in all cases using 3-bromopyruvate therapy to deplete ATP. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004, 324(1): 269-275

29. Kruger P, Saffarzadeh M, Weber AN, Rieber N, Radsak M, von Bernuth H, Benarafa C, Roos D, Skokowa J, Hartl D. Neutrophils: between host defense, immune modulation, and tissue injury. *PLoS Pathog.*, 2015, 11(3): e1004651
30. LaFontaine ER, Cope LD, Aebi C, Latimer JL, McCracken GH Jr, Hansen EJ. The UspA1 protein and a second type of UspA2 protein mediate adherence of *Moraxella catarrhalis* to human epithelial cells in vitro. *J Bacteriol.*, 2000, 182(5): 1364-73
31. Larsen JM, Brix S, Thysen AH, Birch S, Rasmussen MA, Bisgaard H. Children with asthma by school age display aberrant immune responses to pathogenic airway bacteria as infants. *J Allergy Clin Immunol.*, 2014, 133(4): 1008-13
32. Lim JE, Chung E, Son Y. A neuropeptide, Substance-P, directly induces tissue-repairing M2 like macrophages by activating the PI3K/Akt/mTOR pathway even in the presence of IFN γ . *Sci Rep.*, 2017, 7(1): 9417
33. Liu AH. Revisiting the hygiene hypothesis for allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol.*, 2015, 136(4): 860-5
34. Manolov T, Tan TT, Forsgren A, Riesbeck K. *Moraxella*-dependent α 1-antichymotrypsin neutralization: a unique virulence mechanism. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 2008, 38(5): 609-17
35. Martcheva M, Bolker BM, Holt RD. Vaccine-induced pathogen strain replacement: what are the mechanisms? *J R Soc Interface*, 2008, 5: 3-13
36. Masaki H, Qin L, Zhou Z, Onizuka T, Watanabe K, Hu B, Watanabe H. A prospective study of intrafamilial transmission and antimicrobial susceptibility of *Moraxella catarrhalis*. *Microbiol Immunol.*, 2011, 55(9): 599-604
37. Murphy TF. *Moraxella catarrhalis* in chronic obstructive pulmonary disease. Burden of disease and immune response. *Am J Respir Crit Care Med.*, 2005, 172(2): 195-199
38. Murphy TF & Parameswaran GI. *Moraxella catarrhalis*, a human respiratory tract pathogen. *Clin Infect Dis.*, 2009, 49: 124-31
39. Murzyn A, Krasowska A, Stefanowicz P, Dziadkowiec D, Łukaszewicz M. Capric acid secreted by *S. boulardii* inhibits *C. albicans* filamentous growth, adhesion and biofilm formation. *PLoS One*, 2010, 5(8): e12050
40. N'Guessan PD, Vigelahn M, Bachmann S, Zabel S, Opitz B, Schmeck B, Hippenstiel S, Zweigner J, Riesbeck K, Singer BB, Suttorp N, Slevogt H. The UspA1 protein of *Moraxella catarrhalis* induces CEACAM-1- dependent apoptosis in alveolar epithelial cells. *J Infect Dis.*, 2007, 195(11): 1651-60
41. Nordsström T, Blom AM, Tan TT, Forsgren A, Riesbeck K. Ionic binding of C3 to the human pathogen *Moraxella catarrhalis* is a unique mechanism for combating innate immunity. *J Immunol.*, 2005, 175(6): 3628-36
42. Nordström T, Jendholm J, Samuelsson M, Forsgren A, Riesbeck K. The IgD-binding domain of the *Moraxella* IgD-binding protein MID (MID⁹⁶²⁻¹²⁰⁰) activates human B cells in the presence of T cell cytokines. *J Leukoc Biol.*, 2006, 79(2): 319-329
43. O'Donnell R, Breen D, Wilson S, Djukanovic R. Inflammatory cells in the airways in COPD. *Thorax*, 2006, 61(5): 448-54
44. Orczyk-Pawłowicz M, Kątnik-Prastowska I. Terminal monosaccharide expression on amniotic glycoproteins as biomarkers of fetus maturity. *Biochem Soc Trans.*, 2011, 39(1): 344-8
45. Papayannopoulos V, Zychlinski A. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol.*, 2009, 30: 513-21
46. Parameswaran GI, Sethi S, Murphy TF. Effects of bacterial infection on airway antimicrobial peptides and proteins in COPD. *CHEST*, 2011, 140(3): 611-17
47. Parameswaran GI, Wrona CT, Murphy TF, Sethi S. *Moraxella catarrhalis* acquisition, airway inflammation and protease-antiprotease balance in chronic obstructive pulmonary disease. *BMC Infect Dis.*, 2009, 9: 178
48. Pearson MM, Laurence CA, Guinn SE, Hansen EJ. Biofilm formation by *Moraxella catarrhalis* in vitro: roles of the UspA1 adhesin and the Hag hemagglutinin. *Infect Immun.*, 2006, 74: 1588-96
49. Pedersen PL. 3-Bromopyruvate (3BP) a fast acting, promising, powerful, specific, and effective "small molecule" anti-cancer agent taken from labside to bedside: introduction to a special issue. *J Bioenerg Biomembr.*, 2012, 44(1): 1-6
50. Perez AC, Murphy TF. A *Moraxella catarrhalis* vaccine to protect against otitis media and exacerbations of COPD: an update on current progress and challenges. *Hum Vaccin Immunother.*, 2017, 13(10): 2322-2331

51. Perez AC, Pang B, King LB, Tan L, Murrah KA, Reimche JL, Wren JT, Richardson SH, Ghandi U, Swords WE. Residence of *Streptococcus pneumoniae* and *Moraxella catarrhalis* within polymicrobial biofilm promotes antibiotic resistance and bacterial persistence in vivo. *Pathog Dis.*, 2014, 70(3): 280-288
52. Ren D, Almudevar AL, Murphy TF, Lafontaine ER, Campagnari AA, Luke-Marshall N, Casey JR, Pichichero ME. Serum antibody response to *Moraxella catarrhalis* proteins OMP CD, OppA, Msp22, Hag, and PilA2 after nasopharyngeal colonization and acute otitis media in children. *Vaccine*, 2015, 33(43): 5809-5814
53. Ren D, Pichichero ME. Vaccine targets against *Moraxella catarrhalis*. *Expert Opin Ther Targets*, 2016, 20(1): 19-33
54. Reverberi R and Reverberi L. Factors affecting the antigen-antibody reaction. *Blood Transfus.*, 2007, 5 (4): 227-240
55. Rigaud, J-L and Lévy D. Reconstitution of membrane proteins into liposomes. in: *Methods in Enzymol. Liposomes*, Part B. 372 Elsevier Academic Press, Co. Elsevier Inc., 2003, 65-86
56. Romagnani S. The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both? *Immunology*, 2004, 112(3): 352-363
57. Sanders LA, Feldman RG, Voorhorst-Ogink MM, de Haas M, Rijkers GT, Capel PJ, Zegers BJ, van de Winkel JG. Human immunoglobulin G (IgG) Fc receptor IIA (CD32) polymorphism and IgG2-mediated bacterial phagocytosis by neutrophils. *Infect Immun.*, 1995, 63(1): 73-81
58. Schaar¹ V, de Vries SP, Perez Vidakovics ML, Bootsma HJ, Larsson L, Hermans PW, Bjartell A, Mörgelin M, Riesbeck K. Multicomponent *Moraxella catarrhalis* outer membrane vesicles induce an inflammatory response and are internalized by human epithelial cells. *Cell Microbiol.*, 2011, 13(3): 432-49
59. Schaar² V, Nordström T, Mörgelin M, Riesbeck K. *Moraxella catarrhalis* outer membrane vesicles carry β -lactamase and promote survival of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by inactivating amoxicillin. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2011, 55(8): 3845-5
60. Schmitz FJ, Beeck A, Perdikouli M, Boos M, Mayer S, Scheuring S, Köhrer K, Verhoef J, Fluit C. Production of BRO-lactamases and resistance to complement in European *Moraxella catarrhalis* isolates. *J Clin Microbiol.*, 2002, 40(4): 1546-1548
61. Shinoy M, Dennehy R, Coleman L, Carberry S, Schaffer K, Callaghan M, Doyle S, McClean S. Immunoproteomic analysis of proteins expressed by two related pathogens, *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia cenocepacia*, during human infection. *PLoS One*, 2013, 8(11): e80796
62. Shoshan MC. 3-bromopyruvate: Targets and Outcomes. *J Bioenerg Biomembr.*, 2012, 44(1): 7-15
63. Slevogt H, Seybold J, Tiwari KN, Hocke AC, Jonat C, Dietel S, Hippenstiel S, Singer BB, Bachmann S, Suttorp N, Opitz B. *Moraxella catarrhalis* is internalized in respiratory epithelial cells by a trigger-like mechanism and initiates a TLR-2- and partly NOD1-dependent inflammatory immune response. *Cell Microbiol.*, 2007, 9(3): 694-707
64. Slevogt H, Zabel S, Opitz B, Hocke A, Eitel J, N'guessan PD, Lucka L, Riesbeck K, Zimmermann W, Zweigner J, Temmesfeld-Wollbrueck B, Suttorp N, Singer BB. CEACAM1 inhibits Toll-like receptor 2-triggered antibacterial responses of human pulmonary epithelial cells. *Nat Immunol.*, 2008, 9(11): 1270-8
65. Soehnlein O, Oehmcke S, Ma X, Rothfuchs AG, Frithiof R, van Rooijen N, Mörgelin M, Herwald H, Lindbom L. Neutrophil degranulation mediates severe lung damage triggered by streptococcal M1 protein. *Eur Respir J.*, 2008, 32: 405-412
66. Souza-Moreira L, Campos-Salinas J, Caro M, Gonzalez-Rey E. Neuropeptides as pleiotropic modulators of the immune response. *Neuroendocrinology*, 2011, 94: 89-100
67. Ståhlhammar-Carlemalm M, Areschoug T, Larsson C, Lindahl G. Cross-protection between Group A and Group B *Streptococci* due to cross-reacting surface proteins. *J Infect Dis.*, 2000, 182(1): 142-149
68. Su Y-Ch, Singh B and Riesbeck K. *Moraxella catarrhalis* - from interactions with the host immune system to vaccine development. *Future Microbiology*, 2012, 7(9): 1073-1100

69. Tan TT, Mörgelin M, Forsgren A, Riesbeck K. *Haemophilus influenzae* survival during complement-mediated attacks is promoted by *Moraxella catarrhalis* outer membrane vesicles. J Infect Dis., 2007, 195(11): 1661-70
70. Timpe JM, Holm MM, Vanlerberg SL, Basrur V, Lafontaine ER. Identification of *Moraxella catarrhalis* outer membrane protein exhibiting both adhesion and lipolytic activities. Infect Immun., 2003, 71(8): 4341-50
71. Trinh CH, Hemmington SD, Verhoeyen ME, Phillips SE. Antibody fragment Fv4155 bound to two closely related steroid hormones: the structural basis of fine specificity. Structure, 1997, 5(7): 937-948
72. Verhaegh SJ, Flores AR, van Belkum A, Musser JM, Hays JP. Differential virulence gene expression of group A *Streptococcus* serotype M3 in response to co-culture with *Moraxella catarrhalis*. PLoS One, 2013, 8(4): e62549
73. Verhaegh SJ, Stol K, Corné P, de Vogel, Riesbeck K, Lafontaine ER, Murphy TF, van Belkum A, Hermans PW, Hays JP. Comparative analysis of the humoral immune response to *Moraxella catarrhalis* and *Streptococcus pneumoniae* surface antigens in children suffering from recurrent acute otitis media and chronic otitis media with effusion. Clin Vaccin Immunol., 2012, 19: 914-918
74. Verhaegh SJ, Streefland A, Dewnarain JK, Farrell DJ, van Belkum A, Hays JP. Age-related genotypic and phenotypic differences in *Moraxella catarrhalis* isolates from children and adults presenting with respiratory disease in 2001-2002. Microbiology, 2008, 154(Pt 4): 1178-84
75. Vidakovic ML, Jendholm J, Mörgelin M, Månsson A, Larsson C, Cardell LO, Riesbeck K. B cell activation by outer membrane vesicles--a novel virulence mechanism. PLoS Pathog., 2010, 6(1): e1000724
76. Villar CC, Kashleva H, Dongari-Bagtzoglou A. Role of *Candida albicans* polymorphism in interactions with oral epithelial cells. Oral Microbiol Immunol., 2004, 19(4): 262-269
77. Weynants VE, Feron CM, Goraj KK, Bos MP, Denoël PA, Verlant VG, Tommassen J, Peak IRA, Judd RC, Jennings MP, Poolman JT. Additive and synergistic bactericidal activity of antibodies directed against minor outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis*. Infect Immun., 2007, 75(11): 5434-5442
78. Zhou Z-H, Tzioufas AG, Notkins AL. Properties and function of polyreactive antibodies and polyreactive antigen-binding B cells. J Autoimmun., 2007, 29(4): 219-228

D August