

ZAŁĄCZNIK 2

AUTOREFERAT

Dr inż. Maria Podbielska

Laboratorium Białek Sygnałowych

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda
Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu

Wrocław, 31 maja 2018

1. Maria Podbielska

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe / artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

- 27.06.2003 stopień doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biologia, nadany uchwałą Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej (IITD) im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk (PAN) we Wrocławiu na podstawie przedłożonej rozprawy doktorskiej pt.: „Antygeny grupowe A, B i H w glikoforynie A erytrocytów ludzkich”. Promotor: Prof. dr hab. Hubert Krotkiewski, praca doktorska wyróżniona przez Radę Naukową IITD PAN.
- 27.06.1997 dyplom mgr inż. na kierunku Biotechnologia, specjalność: Biotechnologia Molekularna i Biokataliza, Politechnika Wrocławska, Wydział Chemiczny, tytuł pracy magisterskiej: „Identyfikacja antygenów grupowych A i B w oligosacharydach O-glikozydowych glikoforyny ludzkiej”. Promotor: Prof. dr hab. Hubert Krotkiewski, dyplom ukończenia studiów z wyróżnieniem.

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

- 06.2015-04.2016 Research Specialist
Ralph H. Johnson VA Medical Center,
Charleston, SC, USA
Laboratorium Prof. dr. Narena L. Banika
- 11.2014-04.2016 Visiting Research Scholar
Medical University of South Carolina, Department of Neurosciences,
Charleston, SC, USA
Laboratorium Prof. dr. Narena L. Banika
- od 09.2012 Adiunkt
IITD PAN,
Zakład Mikrobiologii, Laboratorium Białek Sygnałowych,
Wrocław, Polska
Laboratorium Prof. dr. hab. Janusza Matuszyka, a następnie pod kierownictwem Prof. dr. hab. Jakuba Siednienko
- 07.2012-08.2012 Visiting Research Scholar
Medical University of South Carolina, Department of Biochemistry and
Molecular Biology, Lipidomics Shared Resource,
Charleston, SC, USA
Laboratorium Prof. dr Alicji Bielawskiej
- 03.2012-06.2012 Visiting Research Scholar
Medical University of South Carolina, Department of Neurosciences,
Charleston, SC, USA
Laboratorium Prof. dr. Narayana R. Bhata

- 07.2011-08.2012 Adiunkt
IITD PAN,
Zakład Immunochemii, Laboratorium Glikokoniugatów,
Wrocław, Polska
Laboratorium Prof. dr. hab. Huberta Krotkiewskiego
- 10.2010-02.2011 Post-doctoral Research Fellow
Heinrich Heine University, Department of Neurology,
Düsseldorf, Germany
Laboratorium Prof. Norberta Goebelsa
- 09.2005-04.2010 Post-doctoral Research Fellow
Georgia Regents University, Institute of Molecular Medicine and Genetics,
Laboratory for Research upon Multiple Sclerosis,
Augusta, GA, USA
Laboratorium Prof. Edwarda L. Hogana
- 05.2004-09.2005 Post-doctoral Research Fellow
Georgia Regents University, Center of Biotechnology and Genomic Medicine,
Augusta, GA, USA
Laboratorium Prof. dr. Piotra Kraja
- 09.1997-06.2011 Asystent
IITD PAN,
Zakład Immunochemii, Laboratorium Glikokoniugatów,
Wrocław, Polska
Laboratorium Prof. dr. hab. Huberta Krotkiewskiego

4. Opis osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.).

a) osiągnięciem w myśl ww. ustawy jest wskazany poniżej jednotematyczny cykl publikacji, dołączony do dokumentacji jako Załącznik nr 4, objęty tytułem:

„Udział wybranych komórek układu odpornościowego i mediatorów w modulowaniu zaburzonej odpowiedzi immunologicznej w stwardnieniu rozsianym”.

1. M. Podbielska and E.L. Hogan. Molecular and immunogenic features of myelin lipids: incitants or modulators of multiple sclerosis? *Mult. Scler.* 15(9), 1011-1029, 2009.

IF^a- 3.279, punkty MNiSW^b-32, Liczba cytowań^{c,d}-28

^a Wartość współczynnika wpływu (IF) zgodnie z rokiem opublikowania.

^b Liczba punktów według polskiego systemu punktacji czasopism (MNiSW), zgodnie z rokiem opublikowania.

^c Liczba cytowań (z uwzględnieniem autocytowań), według bazy Web of Science (WoS, All Databases), stan z dnia 31 maja 2018 r.

^d Według bazy Scopus Elsevier artykuł dodatkowo cytowany w: *Brain Sci.* 3(3)1282-1324, 2013; *Autoimmune Dis.* 1(1), 932351, 2011; *Lipid Tech.* 23 (3), 64-66, 2011; *Clin. Exp. Neuroimmunol.* 1(2), 47-60, 2010 oraz *Audiological Med.* 7(4), 178-179, 2009 (cytowań tych nie uwzględniono w podsumowaniu cytowań).

Indywidualny wkład w autorstwo szacuję na **80%**: wiodący udział w wyborze tematu, analizie i doborze literatury, graficzne zaprojektowanie ryciny przedstawiającej architekturę i molekularną strukturę mieliny (Rycina 1), samodzielne napisanie manuskryptu, przygotowanie odpowiedzi dla recenzentów, ostateczne zredagowanie manuskryptu po recenzjach i przygotowanie pracy do druku.

2. **M. Podbielska**, S. Dasgupta, S.B. Levery, W.W. Tourtellotte, H. Annuk, A.P. Moran, E.L. Hogan. Novel myelin penta- and hexa-acetyl-galactosyl-ceramides: structural characterization and immunoreactivity in cerebrospinal fluid. *J. Lipid Res.* 51(6), 1394-1406, 2010.

IF^a-6.115, punkty MNiSW^b-32, Liczba cytowań^{c,e}-9

Indywidualny wkład w autorstwo szacuję na **80%**: wiodący udział w planowaniu i przeprowadzeniu eksperymentów – izolacja i oczyszczanie FMCs (ang. fast migrating cerebroside), acetylacja GalCer, analiza oczyszczonych preparatów FMC-5, -6 i -7 za pomocą TLC, immunizacja zwierząt, oczyszczanie poliklonalnego przeciwciała anti-FMC-7, badanie immunoreaktywności przeciwciała anti-FMC-7 z lipidem MfGL-II wyizolowanym z *M. fermentans* i lipidem FMC-7 pochodzącym z ludzkiego mózgu oraz przeciwciałami klasy IgG pochodzącymi z płynu mózgowo-rdzeniowego od pacjentów z MS z glikolipidem MfGL-II wyizolowanym z *M. fermentans* i LPS wyizolowanym z *E. coli* J5 za pomocą immuno-TLC, skryning IgG pochodzących z płynu mózgowo-rdzeniowego od chorych z objawami deficytu neurologicznego sugerującymi rozсіяny proces demielinizacyjny oraz z grup referencyjnych, tj. od chorych z objawami uszkodzenia układu nerwowego o podłożu zapalnym lub niezapalnym, na ich antylipidową aktywność z wykorzystaniem testu ELISA; wiodący udział w przygotowaniu pracy do druku, udział w analizie i interpretacji wyników, samodzielne napisanie manuskryptu, przygotowanie odpowiedzi dla recenzentów, ostateczne zredagowanie manuskryptu po recenzjach.

3. **M. Podbielska**, Z.M. Szulc, E. Kurowska, E.L. Hogan, J. Bielawski, A. Bielawska, N.R. Bhat. Cytokine-induced release of ceramide-enriched exosomes as a mediator of cell death signaling in an oligodendroglial cell line. *J. Lipid Res.* 57(11), 2028-2039, 2016.

IF^a- 4.810, punkty MNiSW^b-35, Liczba cytowań^{c,f}-5

^e Według bazy Scopus Elsevier artykuł dodatkowo cytowany w: *Brain Sci.* 3(3)1282-1324, 2013; *Clin. Exp. Neuroimmunol.* 3(3), 89-108, 2012; The immunology of multiple sclerosis (Book Chapter) *Multiple Sclerosis Therapeutics, Fourth Edition* 20-34, 2011 oraz Nuclear magnetic resonance of cerebrospinal fluid: The neurometabolome (Book Chapter) *Methodologies for Metabolomics: Experimental Strategies and Techniques* 257-270, 2010 (cytowań tych nie uwzględniono w podsumowaniu cytowań).

^f Według bazy Scopus Elsevier artykuł dodatkowo cytowany w: *J. Neuroimmunol.* 309, 88-99, 2017 (cytowanie nieuwzględnione w podsumowaniu cytowań).

Indywidualny wkład w autorstwo szacuję na **80%**: pomysłodawca koncepcji przeprowadzonych badań (projekt realizowany w ramach grantu Du Pré sponsorowanego przez Międzynarodową Federację Stwardnienia Rozsianego w Londynie oraz grantu HARMONIA 4 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki); wiodący udział w planowaniu doświadczeń: prowadzenie hodowli linii komórkowej HOG (80% udziału), stymulacja komórek HOG prozapalnymi cytokinami TNF- α i IFN- γ , egzosomami wydzielonymi po traktowaniu komórek ww. cytokinami oraz egzogennym C6- i C16-Cer, analiza żywotności komórek za pomocą testu MTT, izolacja egzosomów, określenie wpływu TNF- α i IFN- γ na komórkowy i egzosomalny poziom sfingolipidów, analiza statystyczna i interpretacja wyników uzyskanych za pomocą tandemowej spektrometrii masowej HPLC-MS/MS - określenie profili lipidowych; wiodący udział we wszystkich etapach prowadzących do przygotowania pracy do druku, w tym: samodzielne napisanie manuskryptu, przygotowanie odpowiedzi dla recenzentów, ostateczne zredagowanie manuskryptu po recenzjach.

4. J. O'Keeffe, **M. Podbielska**, E.L. Hogan. Invariant natural killer cells and their ligands: focus on multiple sclerosis. *Immunology* 145, 468-475, 2015.

IF^a-4.078, punkty MNiSW^b-30, Liczba cytowań^c-10

Indywidualny wkład w autorstwo szacuję na **40%**: artykuł przygotowany na zaproszenie, udział w wyborze tematu, pisanie manuskryptu i przygotowaniu pracy do druku.

5. C. Gately, **M. Podbielska**, T. Counihan, M. Hennessy, T. Leahy, A.P. Moran, E. L. Hogan, J. O'Keeffe. Invariant natural killer T-cell anergy of circulating lymphocytes to myelin polyacetylated- β -galactosyl-ceramides in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 259 (1-2), 1-7, 2013.

IF^a-2.786, punkty MNiSW^b-25, Liczba cytowań^c-8

Indywidualny wkład w autorstwo szacuję na **50 %**: preparacja mieszaniny FMCs z mózgu, izolacja i oczyszczanie FMC-7, udział w planowaniu doświadczeń dotyczących badań funkcjonalnych endogennych składników mieliny, udział w opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu pracy do druku.

6. **M. Podbielska**, A. Das, A. W. Smith, A. Chauhan, S.K. Ray, J. Inoue, M. Azuma, K. Nozaki, E.L. Hogan and N.L. Banik. Neuron-Microglia Interaction Induced Bi-directional Cytotoxicity Associated with Calpain Activation. *J. Neurochem.* 139(3), 440-455, 2016.

IF^a-4.083, punkty MNiSW^b-30, Liczba cytowań^c-8

Indywidualny wkład w autorstwo szacuję na **70%**: współautorstwo w koncepcji badań (projekt realizowany w ramach stypendium sponsorowanego przez Fundację Kościuszkowską oraz grantu finansowanego przez Polsko-Amerykańską Komisję Fulbrighta); izolacja PBMCs (ang. *peripheral blood mononuclear cells*) z krwi obwodowej od pacjentów z MS, aktywacja PBMCs za pomocą przeciwciał anty-CD3 i anty-CD28, prowadzenie hodowli szczurzych neuronów, ich stymulacja za pomocą IFN- γ , wyciszenie genu *kalpainy* za pomocą inhibitorów *kalpainy* (*kalpeptyny* i *SNJ-1945*), jak również techniką siRNA (ang. *small interfering RNA*), ocena żywotności komórek za pomocą testu MTT, analiza statystyczna wyników; wiodący udział w opracowaniu wyników i przygotowaniu pracy do druku: graficzne zaprojektowanie ryciny podsumowującej wyniki (Rycina 8), samodzielne napisanie manuskryptu, przygotowanie odpowiedzi dla recenzentów, ostateczne zredagowanie manuskryptu po recenzjach.

Wprowadzenie

Stwardnienie rozsiane (ang. *multiple sclerosis*, MS) jest przewlekłym schorzeniem ośrodkowego układu nerwowego (ang. *central nervous system*, CNS) o podłożu autoimmunologicznym. W badaniach histopatologicznych tkanek pacjentów z MS stwierdza się nacieki limfocytów T, komórek B i makrofagów oraz uszkodzenie oligodendrocytów i degenerację aksonów (aksonopatię). Morfologicznym wykładnikiem tych zmian jest powstawanie ognisk demielinizacyjnych, tzw. plak. To wieloogniskowe uszkodzenie jest wynikiem nakładania się procesów zapalno-demielinizacyjnych z postępującą aksonopatią i uszkodzeniem neuronów oraz nieefektywną neuroregeneracją w CNS (Zał. 3, IID[2]).

Choroba ma najczęściej przebieg wielofazowy z okresami zaostrzeń (rzutów) i poprawy (remisji) – postać remitująco-nawracająca (ang. *relapsing remitting MS*, RRMS). W późniejszych etapach schorzenia u większości chorych obserwuje się stopniową progresję objawów deficytu neurologicznego – przejście w postać wtórnie postępującą (ang. *secondary progressive MS*, SPMS). U niewielkiego odsetka pacjentów od początku choroba przybiera postać pierwotnie postępującą (ang. *primary progressive MS*, PPMS). Obecnie przyjmuje się, że w fazach choroby z okresami zaostrzeń dominuje proces zapalny, zaś w postaciach PPMS i SPMS dominuje proces neurodegeneracyjny¹. W populacji chorych na MS obserwuje się znaczne różnice indywidualne przebiegu choroby: od postaci łagodnej, z minimalnymi objawami deficytu neurologicznego, do form agresywnych, prowadzących do ciężkiej niesprawności, a nawet zgonu.

Różnorodnej manifestacji klinicznej schorzenia towarzyszy również zróżnicowanie pod względem histopatologicznym. Zmiany zapalno-demielinizacyjne zlokalizowane ogniskowo w istocie

białej CNS są najbardziej typową neuropatologiczną zmianą początkowego okresu choroby. W fazie progresywnej schorzenia dominuje rozlany proces zapalny, obejmujący całe mózgowie wraz z oponami mózgowo-rdzeniowymi. Ostre ogniska demielinizacyjne zlokalizowane są najczęściej w istocie białej, aczkolwiek ich obecność wykazano także w istocie szarej CNS². Szczegółowe badania histopatologiczne umożliwiły podział aktywnych plak demielinizacyjnych na cztery odrębne podtypy charakteryzujące się zróżnicowanymi cechami nagromadzenia komórkowych i humoralnych elementów układu odpornościowego oraz zmianami demielinizacyjnymi o różnym stopniu nasilenia³.

Dotychczas nie poznano wszystkich mechanizmów powodujących uruchomienie zespołu procesów, skutkujących eskalacją odpowiedzi autoimmunologicznej, prowadzących w konsekwencji do wytworzenia rozszanych zmian demielinizacyjnych istoty białej i szarej w CNS. Powszechnie uważa się, że u osób podatnych genetycznie może dochodzić do aktywacji autoreaktywnych limfocytów T pod wpływem różnych czynników, np. infekcji niezidentyfikowanym dotychczas patogenem wirusowym lub bakteryjnym. Aktywacji odpowiedzi autoimmunologicznej i klinicznej manifestacji schorzenia sprzyjają prawdopodobnie również inne bodźce, m. in. przestrojenie hormonalne, niedobór witaminy D, stres. Wczesne rozpoznanie choroby, jak również wczesne prognozowanie jej przebiegu są nadal utrudnione. Mimo licznych badań nie znaleziono dotychczas specyficznych biomarkerów przydatnych w tej dziedzinie. Podobne trudności związane są z monitorowaniem postępujących procesów zapalnych i neurodegeneracyjnych oraz przewidywaniem odpowiedzi na wdrożone leczenie u poszczególnych pacjentów. Zalecane obecnie strategie terapeutyczne w MS obejmują: leczenie rzutu (dożylne krótkotrwałe podanie kortykosteroidów), długotrwałą modyfikację przebiegu choroby (leki immunomodulacyjne) oraz leczenie objawowe, eliminujące lub łagodzące poszczególne objawy neurologiczne⁴. Szeroki wachlarz leków immunomodulacyjnych obejmuje: i) podawane podskórnie lub domięśniowo – IFN β -1 α (Avonex, Rebif), IFN β -1 β (Betaferon) oraz kopolimer składający się z 4 aminokwasów – octan glatirameru (Copaxone); ii) podawane doustnie – chlorowodorek 2-amino-2-[2-(4-oktylofenylo)etylo]propano-1,3-diolu, znany również pod nazwą fingolimodu (Gilenya), dimetylofumaran (Tecfidera), teryflunomid (Aubagio) oraz iii) podawane dożylnie – przeciwciało skierowane przeciwko podjednostce α 4 integryny VLA-4 (ang. *very late antigen 4*) aktywnych limfocytów, preparaty biologiczne: natalizumab (Tysabri) i alemtuzumab (Lemtrada). W postaciach postępujących MS podejmuje się próby leczenia immunosupresyjnego (azatiopryna, metotrexat, mitoksantron).

Pomimo znacznego postępu prac nad nowymi lekami, możliwości leczenia MS są nadal ograniczone, a obecnie dostępne terapie nie spełniają pokładanych w nich nadziei. Przeważająca część leków jedynie modyfikuje przebieg MS, a nie trwale powstrzymuje, czy odwraca proces chorobowy co w konsekwencji prowadzi do pogłębiającej się niesprawności pacjentów. Dodatkowo, oddziaływanie większości stosowanych leków jest ukierunkowane na proces zapalno-

demielinizacyjny. Jedynie w przypadku nielicznych wykazano efekt neuroprotektoryjny, jednakże dla żadnego z nich nie udowodniono skutecznego działania spowalniającego fazę progresywną schorzenia⁵.

Dokładne poznanie mechanizmów patofizjologii MS jest więc wielkim wyzwaniem dla neuroimmunologów. Umożliwiłoby to poszerzenie wiedzy na temat molekularnych zależności prowadzących do uszkodzenia istoty białej i szarej w CNS. Co istotniejsze, poznanie tych mechanizmów, mogłoby być inspiracją do poszukiwania nowych, efektywniejszych i bezpieczniejszych metod terapeutycznych, opartych na celowanej ingerencji farmakologicznej mającej na celu zapobieganie określonym procesom patologicznym (zapalna demielinizacja, neurodegeneracja) oraz skuteczne pobudzanie procesów naprawczych, takich jak remielinizacja⁶.

Rola układu odpornościowego w rozwoju MS. Efektywna odpowiedź odpornościowa organizmu zależy od ścisłej kooperacji wzajemnie uzupełniających się mechanizmów odporności wrodzonej i nabytej, jednakże stopień ich powiązania nie jest ostatecznie określony. Kluczowe funkcje układu immunologicznego to rozpoznanie i eliminacja różnorodnych patogenów oraz tolerancja na własne antygeny. Odporność nabyta związana jest z obecnością antygenowo swoistych receptorów na komórkach B i T, które powstają w wyniku somatycznej rearanżacji genów. Cechą charakterystyczną odpowiedzi immunologicznej jest wysoka swoistość wiązania określonego antygeny, warunkująca tzw. pamięć immunologiczną, umożliwiającą szybszą i skuteczniejszą odpowiedź układu odpornościowego przy ponownym kontakcie z tym samym antygenem. Odporność nabyta (swoista) jest wynikiem złożonej sekwencji zdarzeń z udziałem różnych subpopulacji limfocytów T (odpowiedź komórkowa) oraz limfocytów B i komórek plazmatycznych (odpowiedź humoralna)⁷. Odporność wrodzona (nieswoista) odpowiada za stymulację i modulację odporności nabytej. Pierwsza linia obrony obejmująca bariery anatomiczne, takie jak skóra, błony śluzowe żołądka, jelit i układu oddechowego, zapobiega inwazji czynników chorobotwórczych. Zaporę do miejsca immunologicznie uprzywilejowanego, jakim jest CNS, stanowi złożona w swej budowie bariera krew-mózg. Drugą linię obrony stanowią komórki odpornościowe warunkujące odpowiedź wrodzoną, m.in. komórki dendrytyczne, komórki tuczne, makrofagi, mikroglej, astrocyty oraz różne populacje limfocytów, takich jak: limfocyty T $\gamma\delta$, komórki MAIT (ang. *mucosal-associated invariant T cells*), limfocyty B1, komórki B strefy brzeżnej (ang. *marginal zone B cells*) oraz komórki NK (ang. *natural killer*)⁸. Odporność wrodzona wykorzystuje nabyty ewolucyjnie szereg receptorów zwanych PRR (ang. *pathogen recognition receptor*), rozpoznających: i) molekularne wzorce patogenów (ang. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs), tj. struktury charakterystyczne dla drobnoustrojów bądź też ii) molekularne wzorce sygnalizujące „zagrożenie” (ang. *danger-associated molecular patterns*, DAMPs), tj. własne cząsteczki uwolnione na skutek uszkodzenia komórki bądź jej śmierci⁹.

Od wielu lat toczy się szeroka dyskusja dotycząca przyczyn powstawania MS, a w szczególności przyczyny pierwotnej, inicjującej kaskadę procesów prowadzących do zmian morfologicznych i histologicznych w CNS w etiopatogenezie MS. Uważa się, że zasadniczą rolę odgrywa tutaj zaburzona odpowiedź immunologiczna. Nie zostało dotychczas w pełni wyjaśnione, jakie czynniki wpływają na załamanie bariery krew-mózg, skutkujące penetracją limfocytów T i B do CNS. Badania ostatniej dekady przyczyniły się do znacznego postępu w zrozumieniu roli obu segmentów układu odpornościowego i powiązaniu ich z różnymi etapami MS (Zał. 3, IIA[1]). Wykazano, że podczas gdy odporność nabyta odpowiada za stymulację ostrych procesów zapalnych, odporność wrodzona odgrywa większą rolę w patomechanizmach postępującego stadium MS.

Cele badawcze

Przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe obejmuje serię sześciu artykułów (Załącznik 5), które łączy cel ogólny, jakim jest wyjaśnienie mechanizmów leżących u podstaw zapalnej demielinizacji i postępującej neurodegeneracji w MS. Badania te, zgodnie z moimi zainteresowaniami, skupiały się głównie na problemach dotyczących zaburzonej odpowiedzi immunologicznej w MS, a szczególnie na roli glikosfingolipidów (ang. *glycosphingolipids*, GSLs) w tym procesie. Postęp w tej dziedzinie zamierzano uzyskać poprzez realizację następujących celów szczegółowych:

- charakterystyka strukturalna GSLs związanych z mieliną;
- badanie immunogennych właściwości tych GSLs, prowadzących do produkcji autoprzeciwciał;
- wyjaśnienie roli produktów degradacji GSLs, którym przypisuje się funkcję bioaktywnych mediatorów uszkadzających osłonkę mielinową aksonów u pacjentów z MS;
- określenie immunoregulacyjnych mechanizmów odpowiedzialnych za immunologiczną tolerancję na antygeny własne i zdefiniowanie funkcji komórek NKT (ang. *natural killer T cells*) u pacjentów z MS;
- próba identyfikacji potencjalnych immunologicznych biomarkerów, użytecznych w ocenie aktywności procesu zapalnego oraz ocenie progresji schorzenia w jego postępujących postaciach.

Prezentowana rozprawa habilitacyjna dotyczy udziału wybranych komórek układu odpornościowego i towarzyszących im mediatorów w powiązaniu z różnymi etapami MS. Poznawczy walor przedstawionych publikacji związany jest z odkryciem nowych elementów leżących u podstaw patofizjologii MS. Ponadto, prezentowane wyniki mogą mieć implikacje kliniczne.

Inicjacja choroby

Limfocyty B i odpowiedź humoralna

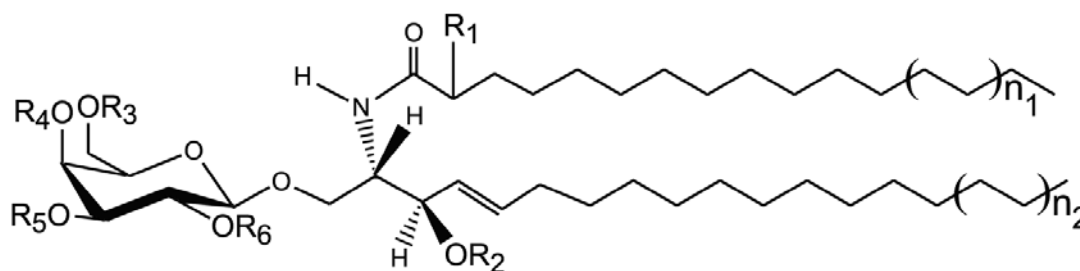
W ostatnim czasie opublikowano wiele prac, w których podjęto próby wyjaśnienia procesu zapalnej demielinizacji w patogenezie MS. Wykazano, że limfocyty B pełnią istotną rolę w tym procesie¹⁰. Przenikają one przez uszkodzoną barierę krew-mózg i w CNS przekształcają się w komórki plazmatyczne¹¹. Konsekwencją tego jest synteza immunoglobulin (ang. *immunoglobulins*, Igs) w płynie mózgowo-rdzeniowym (ang. *cerebrospinal fluid*, CSF), o czym świadczy podwyższony indeks IgG. Należy podkreślić, że u ponad 90% pacjentów z klinicznie potwierdzonym MS obserwuje się wzrost stężenia Igs, głównie podklas IgG₁ i IgG₃, w CSF, lecz nie w surowicy¹². Analiza elektroforetyczna przeciwciał pochodzących z CSF wykazała obecność charakterystycznych oligoklonalnych prążków (ang. *oligoclonal bands*, OCBs) pochodzących od ulegających klonalnej ekspansji limfocytów B. Obecność OCBs w płynie mózgowo-rdzeniowym chorych na MS wskazuje na zaburzenia odpowiedzi humoralnej. Fakt występowania odrębnego dla każdego chorego niezmiennego wzorca OCBs, wzorca który nie ulega modyfikacjom pod wpływem leczenia przemawia za trwałą, niezależną od statusu klinicznego, dysfunkcją humoralną. Obecność OCBs w CSF i wskaźnik ich aktywnej produkcji nie są głównymi ani specyficznymi wskaźnikami diagnostycznymi w MS, aczkolwiek stanowią istotne czynniki prognostyczne¹³.

Limfocyty B wykazują wielokierunkowe działanie w procesie zapalnym w MS, bowiem są w stanie pełnić rolę komórek APCs i stymulować autoreaktywne limfocyty T. Produkowane przeciwciała mogą przyczyniać się do opsonizacji i uczestniczyć w zależnej od przeciwciał komórkowej cytotoksyczności (ang. *antibody dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) i/lub aktywować składniki dopełniacza, a w konsekwencji prowadzić do uszkodzenia oligodendrocytów w CNS. W sferze dyskusji pozostaje jednak, czy limfocyty B są pierwszorzędowym elementem inicjującym proces patologiczny, czy też wtórnym, tzn. ulegają aktywacji wskutek wcześniej zapoczątkowanego procesu zapalnego w obrębie CNS.

Potencjalni "kandydaci" autoimmunologicznego ataku. Od dawna bezskutecznie podejmowano próby ustalenia swoistości antygenowej przeciwciał występujących w CSF chorych na MS. Początkowo badania koncentrowały się na poszukiwaniu Igs skierowanych przeciwko egzogennym antygenom bakteryjnym i wirusowym, w myśl istniejącej koncepcji infekcyjnego podłoża MS. Zgodnie z nią uważa się, że wpływ na zapoczątkowanie rozwoju MS mogą mieć zakażenia wirusami: odry, świnki, opryszczki (HSV-1), ospy wietrznej (VZV), cytomegalii (CMV), Epsteina-Barr (EBV)¹⁴⁻¹⁷. Udział w rozwoju MS przypisywano również zakażeniom bakteryjnym wywołanym przez *Hemophilus influenzae*¹⁸, *Escherichia coli*¹⁹, *Acinetobacter sp.* i *Pseudomonas aeruginosa*²⁰, *Chlamydia*

*pneumoniae*²¹ oraz *Mycoplasma pneumoniae*²². Dotychczas jednak nie udało się jednoznacznie ustalić, który z patogenów może mieć kluczowe znaczenie w rozwoju tego schorzenia. Kolejna hipoteza zakładała, że przeciwciała obecne w CNS są skierowane przeciwko endogennym antygenom pochodzącym głównie z osłonki mielinowej **[publikacja 1]**. Zidentyfikowano autoprzeciwciała reagujące z białkami tej osłonki, w tym z: zasadowym białkiem mieliny (ang. *myelin basic protein*, MBP), lipofiliną (ang. *proteolipid protein*, PLP), glikoproteiną oligodendrocytów (ang. *myelin oligodendrocyte glycoprotein*, MOG), białkiem związanym z mieliną (ang. *myelin-associated protein*, MAG), białkiem specyficznym dla oligodendrocytów (ang. *oligodendrocyte-specific protein*, OSP) oraz fosfodiesterazą 2',3' cyklicznych nukleotydów (ang. *2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase*, CNP)²³⁻²⁵. Podobnie jak poprzednio, udział tych przeciwciał we frakcji IgG w CSF był niewielki i nie odpowiadał głównym OCBs.

Jak dotąd główny nurt poszukiwań czynnika indukującego odpowiedź immunologiczną u pacjentów z MS skupiał się głównie na białkach osłonki mielinowej. Rola antygenów lipidowych – stanowiących 80% mieliny w CNS – nie została dotychczas jasno sprecyzowana. Lipidowe komponenty mieliny w CNS stanowią: fosfolipidy, GSLs oraz będący steroidem, cholesterol. Grupę fosfolipidów reprezentują fosfatydyloetanolamina, fosfatydylocholina, fosfatydyloseryna, fosfatydyloinozytol oraz należąca do fosfosfingolipidów, sfingomielina (ang. *sphingomyelin*, SM). Główny glikosfingolipidowy składnik mieliny – należący do cerebrozydów – β -galaktozyloceramid (β -GalCer) stanowi ok. 32% lipidów w CNS. Inne glikosfingolipidowe komponenty to jego kwaśne pochodne siarczanowe i sialowane oraz zaliczana do neutralnych cerebrozydów rodzina pochodnych 3-acetylo-sfingozyno- β -GalCer. Ich przykładami są odpowiednio sulfatydy (sGalCer), gangliozydy (GM₄ i GM₁) oraz po raz pierwszy odkryte i scharakteryzowane strukturalnie przez zespół Hogana „szybko migrujące cerebrozydy” (ang. *fast migrating cerebrosides*, FMCs). Nazwa tych ostatnich pochodzi od wartości współczynnika opóźnienia R_f (ang. *retardation factor*) oznaczonego w chromatografii cienkowarstwowej. Opisano siedem struktur FMCs należących do glikosfingolipidowej rodziny cechującej się obecnością unikalnej O-acetylacji na węglu C3 reszty sfingozyny (**Ryc. 1**). Najprostsze FMCs (FMC-1 i FMC-2) scharakteryzowano jako 3-O-acetylo-sfingozyno- β -GalCer, zawierające odpowiednio pozbawiony grupy hydroksylowej kwas tłuszczowy (ang. *non-hydroxy fatty acid*, NFA) lub 2-hydroksykwas tłuszczowy (ang. *2-hydroxy fatty acid*, 2-HFA) przyłączony do reszty sfingozyny²⁶. Kolejne dwa – FMC-3 i FMC-4 – to analogi FMC-1 i FMC-2 z dodatkową grupą acetylową podstawioną na węglu C6 galaktozy²⁷. Bardziej złożone – FMC-5, FMC-6 i FMC-7 – odkryte później, stanowią przedmiot niniejszej rozprawy habilitacyjnej **[publikacja 2]**. FMC-5 i FMC-6 zidentyfikowano jako 3-O-acetylo-sfingozyno-2,3,4,6-tetra-O-acetylo- β -GalCer



Rycina 1. Zaproponowane struktury FMCs.

FMC-1: R1 = H, R2 = Ac, R3–R6 = H; **FMC-2:** R1 = OH, R2 = Ac, R3–R6 = H;

FMC-3: R1 = H, R2 = Ac, R3 = Ac, R4–R6 = H; **FMC-4:** R1 = OH, R2 = Ac, R3 = Ac, R4–R6 = H;

FMC-5: R1 = H, R2–R6 = Ac; **FMC-6:** R1 = OH, R2–R6 = Ac; **FMC-7:** R1 = OAc, R2–R6 = Ac;

Ac-grupa acetylowa.

z odpowiednio: pozbawionym grupy hydroksylowej kwasem tłuszczowym i 2-hydroksykwasem tłuszczowym [**publikacja 2**]. Najbardziej hydrofobowy, FMC-7 określono jako 3-*O*-acetylo-sfingozyno-2,3,4,6-tetra-*O*-acetylo-β-GalCer (2-*O*-acetylo-HFA) [**publikacja 2**]. Charakterystykę strukturalną FMCs jak również fizjologiczną rolę tych struktur przedstawiono w pracy przeglądowej (Zał. 3, IIA[5]).

Opisane powyżej mielinowe antygeny lipidowe nie były dotychczas uwzględniane jako cel autoimmunologicznego ataku w MS. Aczkolwiek fakt, że są one niewątpliwie głównymi składnikami mieliny, może stanowić podwaliny do wysunięcia hipotezy, że „*odpowiedź immunologiczna w MS jest skierowana przeciwko lipidowym antygenom mieliny, pełniącym w tym przypadku rolę immunogenów*”. W badaniach przeprowadzonych w grupie chorych z rozpoznaną postacią RRMS zidentyfikowano przeciwciała anty-GalCer²⁸. Przeciwciała te promowały proces zapalno-demielinizacyjny^{29, 30}. Ich obecności nie stwierdzono natomiast u pacjentów we wczesnym okresie choroby podczas pierwszej manifestacji klinicznej (ang. *clinical isolated syndrome*, CIS). Dlatego interesujące mogłoby być wykorzystanie faktu ich pojawienia się jako wskaźnika rozpoznania, spełniającego kryteria McDonald’a, klinicznie pewnego MS³¹. W CSF pacjentów z MS stwierdzono również obecność przeciwciał skierowanych przeciwko innym lipidom tj. gangliozyd³²⁻³⁴, sGalCer^{35, 36} i ich kompleksom³⁷, fosfolipidom³⁸ a także utlenionym fosfolipidom, utlenionym sterolom i SM^{37, 39, 40}. Te liczne doniesienia wskazują jednoznacznie na zaburzenie mechanizmu immunologicznej tolerancji komórek B, ale żadne z nich nie dowodzi w sposób przekonujący istnienia swoistych dla MS przeciwciał. Wydaje się, że potwierdzenie obecności wyżej opisanych przeciwciał w CSF w kontekście znanych immunogennych właściwości lipidów czyni z nich jeden z kluczowych elementów patogenezy MS. Rola zarówno antygenów lipidowych, jak i anty-lipidowych przeciwciał w odniesieniu do patofizjologii MS stanowi przedmiot dyskusji w **publikacji 1**.

Podsumowując, jak dotąd nie potwierdzono również swoistości oligoklonalnych Igs skierowanych przeciwko składowym elementom CNS. Analiza tak wielu potencjalnych antygenów jest trudna i dowodzi złożoności patologicznego procesu w MS. Przeciwno istnieniu jednego, kluczowego dla rozwoju MS, antygenu przemawia także bardzo duże zróżnicowanie obrazu klinicznego i przebiegu choroby w populacji pacjentów. Bardziej prawdopodobne wydaje się istnienie wspólnego patomechanizmu zapoczątkowanego przez różne antygeny. Mimo rosnącej wiedzy na temat czynników biorących udział w patogenezie MS, pytanie o antygeny odpowiedzialne za zapoczątkowanie odpowiedzi autoimmunologicznej pozostaje jednak nadal otwarte. Podwyższony poziom Igs w CSF, jako wskaźnik uszkodzenia CNS, stanowi wciąż intrygujące wyzwanie dla naukowców zajmujących się patofizjologią MS. Próba identyfikacji anty-lipidowych przeciwciał swoistych dla MS w zależności od manifestacji klinicznej schorzenia może okazać się kluczowa dla pełniejszego zrozumienia patomechanizmów demielinizacji. Przeciwciała te mogłyby być wciąż poszukiwanymi biomarkerami pozwalającymi na określenie aktywności i przebiegu choroby oraz monitorowanie skuteczności zastosowanego leczenia.

Próbkę takiej identyfikacji podjęto w zespole Hogana poszukując swoistych przeciwciał w CSF skierowanych przeciwko nowo odkrytym lipidowym składnikom mieliny, tj. FMCs **[publikacja 2]**. Zakładano, że te mielinowe acetylo-cerebrozydy mogą przypominać acylowe i/lub acetylowane pochodne cukrów lipopolisacharydu bądź glikolipidy zakotwiczone w warstwie zewnętrznej ściany komórkowej wielu bakterii. Biorąc pod uwagę molekularną mimikrę, jako jeden z patomechanizmów prowadzących do autoimmunologicznego ataku, podjęto próbę określenia strukturalnych podobieństw pomiędzy endogennymi a egzogennymi antygenami przyczyniających się w konsekwencji do krzyżowej reaktywności skierowanych przeciwko nim przeciwciał. W badaniach tych skoncentrowano się na endogennych antygenach lipidowych występujących w osłonce mielinowej m.in. FMC-7, GalCer i sGalCer. Egzogenne antygeny pochodzenia bakteryjnego stanowiły:

- i) glikoglicerolipid zawierający fosfocholinę – MfGL-II – pochodzący z *Mycoplasma fermentans*⁴¹ oraz
- ii) oczyszczone lipopolisacharydy wyizolowane z: *Chlamydia pneumoniae*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori* i *Escherichia coli*. Zaobserwowana krzyżowa reaktywność przeciwciała anty-FMC-7 z lipidem MfGL-II oraz z lipopolisacharydem z *E. coli* J5, wydawała się potwierdzać słuszność zakładanej hipotezy. Alternatywnie przeprowadzono analizę przeciwciał klasy IgG pochodzących z CSF od chorych z objawami deficytu neurologicznego sugerującymi rozсіяny proces demielinizacyjny, sklasyfikowanych w głównych podtypach klinicznych oraz grup referencyjnych chorych z objawami uszkodzenia CNS o podłożu zapalnym (I-OND)* lub niezapalnym (NI-OND)♦ **[publikacja 2]**. Grupa I-OND obejmowała chorych z zapaleniem opon mózgowych, zapaleniem opon

* I-OND (ang. *inflammatory other neurological disease*)

♦ NI-OND (ang. *non-inflammatory other neurological disease*)

mózgowych i rdzenia oraz podostrym stwardniającym zapaleniem mózgu (ang. *subacute sclerosing panencephalitis*, SSPE). Największą reaktywność przeciwko najbardziej hydrofobowemu z rodziny acetylowanych pochodnych β -GalCer, tj. antygenowi FMC-7 obserwowano w grupie I-OND. Dodatkowo, w grupie tej stwierdzono znacznie podwyższony poziom przeciwciał skierowanych przeciwko egzogennym antygenom bakteryjnym pochodzącym z *M. fermentans* i *E. coli* J5. Badania wykazały również, że poziom przeciwciał anti-FMC-7 był znacznie wyższy u chorych z postacią kliniczną PPMS w porównaniu z SPMS ($p < 0,05$) oraz w podtypie RRMS w fazie remisji w porównaniu z SPMS ($p < 0,05$). Tylko niektórzy z badanych pacjentów z MS wykazywali podwyższone miano przeciwciał zarówno, przeciwko endogennym antygenom mieliny, jak i egzogennym antygenom pochodzenia bakteryjnego. Fakt ten może świadczyć o tym, że w przypadku niektórych pacjentów z MS immunoreaktywność ta jest istotna dla patogenezы schorzenia. Pozostaje to w zgodzie z uznaną różnorodnością, zarówno w patologii, jak i prezentacji klinicznej MS.

Uzyskane przez nas wyniki sugerują biologicznie istotną korelację między infekcją *M. fermentans* lub *E. coli* J5, a zapalną demielinizacją **[publikacja 2]**. W świetle obecnych badań uważa się, że patogeny wirusowe bądź bakteryjne mogą inicjować, lub zaostrzać choroby autoimmunizacyjne na drodze różnych mechanizmów⁴²⁻⁴⁵. Nasze dane ilustrują znaczenie molekularnej mimikry w inicjacji chorób autoimmunizacyjnych w CNS. Patomechanizm ten jest jednym z dwóch obecnie postulowanych mechanizmów, na drodze których czynnik infekcyjny może potencjalnie brać udział w inicjowaniu procesu patologicznego w MS. Druga teoria przypisuje kluczową rolę przypadkowej aktywacji, tzw. *bystander activation*, komórek układu odpornościowego. Aktywacja ta może być wynikiem działania cytokin wytwarzanych w trakcie odpowiedzi na infekcję bądź wolnych rodników tlenowych wydzielanych przez zaktywowane komórki odpornościowe. Zaburzona odpowiedź immunologiczna może być także inicjowana w wyniku zwiększonej aktywacji komórek APCs za pośrednictwem receptorów rozpoznających patogenne antygeny, zwłaszcza receptorów TLR (ang. *Toll-like receptor*) lub limfocytów T przez superantygeny. Oba sposoby mogą powodować przypadkową, niespecyficzną aktywację zarówno wrodzonych, jak i nabytych mechanizmów odpornościowych i stymulować odpowiedź autoimmunologiczną, wywołaną bezpośrednio przez czynnik zakaźny lub pośrednio przez zaktywowane komórki w kierunku bardziej efektywnej prezentacji antygenów własnych. Nie wyklucza się również krzyżowej odpowiedzi immunologicznej na latentną infekcję w CNS z antygenem/antygenami obecnymi w tym układzie. Za słusznością powiązania molekularnej mimikry z patogenezą MS przemawia również identyfikacja homologii sekwencji genów białek mielinowych oraz wirusowych i bakteryjnych kwasów nukleinowych.

Mimo, iż badano udział wielu czynników infekcyjnych mogących wpływać na rozwój MS, nie wykazano ich powiązania z etiologią tego schorzenia. Niemniej jednak w dalszym ciągu istnieje duże

prawdopodobieństwo, że infekcja odgrywa istotną rolę w inicjacji MS. FMCs mogą być potencjalnym kandydatem ataku autoimmunologicznego, skierowanego początkowo na bakteryjną grupę acylową i/lub acetylową sprzężoną z glikozydem, prowadzącego do zapalnej demielinizacji w CNS. W trakcie infekcji, w przeciwieństwie do peptydów, które znajdują się wewnątrz, te złożone lipofilowe cząsteczki zlokalizowane na powierzchni bakterii po raz pierwszy konfrontują się z układem odpornościowym gospodarza. Przypuszczalnie jako "pierwotne antygeny" mogą one odgrywać rolę w zapoczątkowaniu odpowiedzi autoimmunologicznej. W wyniku tego dochodzi do załamania immunologicznej tolerancji i krzyżowej reaktywności, w konsekwencji do zainicjowania zapalnej demielinizacji a w rezultacie do ukonstytuowania się rozszianych objawów deficytu neurologicznego obserwowanych w MS. Nasze wyniki sugerują molekularną mimikrę, dzięki której reakcja systemu obronnego gospodarza w odpowiedzi na infekcję lub sygnał oznajmiający "zagrożenie" przekształca się w samodestrukcyjny atak. Znaczenie nowych lipidowych składników mieliny, tj. FMCs, w kontekście rozwoju schorzeń demielinizacyjnych takich jak MS podsumowano w pracach przeglądowych (Zał. 3, IIA[5] i IID[3]).

Warto nadmienić, że molekularna mimikra została zaproponowana jako kluczowy element patomechanizmu w przypadku różnych schorzeń występujących w obwodowym układzie nerwowym (ang. *peripheral nervous system*, PNS) (Zał. 3, IIA[5]). U około 50% pacjentów z zespołem Guillain Barré (ang. *Guillain Barré syndrom*, GBS) i jego wariantami pod postacią ostrej ruchowej neuropatii aksonalnej (ang. *acute motor axonal neuropathy*, AMAN), ostrej ruchowej i czuciowej neuropatii aksonalnej (ang. *acute motor sensory axonal neuropathy*, AMSAN) oraz zespołu Millera Fischera (ang. *Miller Fischer syndrom*, MFS) stwierdzono obecność przeciwciał klas IgA i IgG przeciwko gangliozydom i ich pochodnym. Interesujące jest to, że w przypadku czystych ruchowych lub aksonalnych postaci – AMAN i AMSAN – przeciwciała te są skierowane przeciwko GM₁, GM_{1b}, GD_{1a}, GalNAcGD_{1a}, natomiast w przypadku GBS skutkującym oftalmoplegią oraz MFS, przeciwciała te reagują z GQ_{1b}, GD₃ i GT_{1a}. Cięższy przebieg GBS obserwuje się w przypadku obecności przeciwciał skierowanych przeciwko GM₁. Innymi chorobami, w rozwoju których stwierdza się obecność tych przeciwciał są m.in. przewlekła zapalna polineuropatia demielinizacyjna (ang. *chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy*, CIDP) z obecnymi przeciwciałami przeciwko GM₁ i LM₁; wieloogniskowa neuropatia ruchowa (ang. *multifocal neuropathy*, MMN) z występującymi w 33% przypadków przeciwciałami klasy IgM przeciwko GM₁ i GM_{1a} oraz neuropatia czuciowa z przeciwciałami przeciwko GD_{1b} i disjalogangliozydom. Z kolei przeciwciała anty-sGalCer klasy IgM wykryto w aksonalnej neuropatii czuciowej dotyczącej zarówno cienkich, jak i grubych, lub jedynie cienkich włókien nerwowych. Powstawanie autoagresywnych przeciwciał przeciwko gangliozydom może wynikać z antygenowej mimikry pomiędzy gangliozydami a lipo-oligosacharydowymi antygenami *Campylobacter jejuni* w efekcie zakażenia tą bakterią. Nie jest także wykluczone, że

Haemophilus influenzae, czy cytomegalowirus wykazują właściwości podobne do *C. jejuni*; w ostatnim przypadku obserwuje się bowiem pojawienie przeciwciał przeciwko GM₂.

Limfocyty pomocnicze Th1/Th17

Najnowsze badania przypisują istotną rolę w rozwoju i progresji MS efektorowym komórkom T CD4⁺. Aktywacja komórek T CD4⁺ na obwodzie, tj. poza CNS, oraz dysregulacja wydzielanych przez pomocnicze limfocyty Th1, Th2 i Th17 cytokin są uważane za główne czynniki inicjujące MS⁴⁶. W wyniku aktywacji komórek T CD4⁺, przy nieprawidłowo funkcjonujących mechanizmach tolerancji obwodowej pobudzonych limfocytów, dochodzi do klonalnej ekspansji autoreaktywnych komórek T. Zaktywowane komórki przełamują barierę krew-mózg i rozpoczynają złożoną kaskadę procesów prowadzących do zapalnej demielinizacji.

Postuluje się, że w MS dochodzi do zaburzenia równowagi pomiędzy, mediowaną przez komórki Th1, odpowiedzią zapalną typu Th1 charakteryzującą się prozapalnym profilem sekrecji cytokin (m.in. TNF-α, IFN-γ, IL-2, IL-12, IL-15) oraz odpowiedzią typu Th2, zależną od limfocytów Th2 wydzielających preferencyjnie cytokiny o działaniu przeciwzapalnym lub regulacyjnym (m.in. IL-4, IL-5, IL-10, IL-13)⁴⁷. Tak więc, limfocyty T CD4⁺ w MS wykazują wyraźne przesunięcie profilu reakcji w kierunku Th1 w porównaniu do osób zdrowych⁴⁸. Dodatkowo wykazano korelację między stopniem zaawansowania choroby a profilem Th1 odpowiedzi autoreaktywnych limfocytów T CD4⁺.

Dowodzono również, że inna subpopulacja komórek T, tj. komórki Th17 i wydzielana przez nie IL-17, odgrywa zasadniczą rolę w immunopatologii MS⁴⁹. W porównaniu z niezapalnymi chorobami neurologicznymi u chorych na MS, zarówno we krwi jak i w CNS, stwierdzono wzrost ekspresji IL-17⁵⁰. Wykazano także, że liczba limfocytów Th17 znacznie wzrasta w czasie rzutu choroby. Komórki te charakteryzują się wyższą ekspresją markerów aktywacji oraz cząsteczek kostymulujących niż limfocyty Th1. Badania *in vitro* wykazały, że limfocyty Th17 przechodzą przez barierę krew-mózg skuteczniej niż limfocyty T innych subpopulacji⁵¹. Ponadto IL-17 powoduje uszkodzenie tej bariery, co prowadzi do zwiększenia napływu do CNS innych cytokin oraz neutrofili i monocytów⁵². Limfocyty Th17, oprócz IL-17, produkują w CNS również inne cytokiny prozapalne (IL-21, IL-22) oraz mają zdolność bezpośredniego uszkodzenia neuronów.

Powyższe dane sugerują zaangażowanie w fazę efektorową procesu patologicznego obu populacji komórek prozapalnych, podkreślając istotne znaczenie interakcji pomiędzy limfocytami Th1 i Th17 w autoimmunizacyjnych schorzeniach CNS.

Rola bioaktywnych sfingolipidowych mediatorów w zapalnej demielinizacji indukowanej za pomocą TNF-α i IFN-γ. Sfingolipidowe antygeny lipidowe są ważnymi mediatorami procesu zapalnego powodującymi uszkodzenie komórek w CNS (Zał. 3, IIA[4]). Wcześniejsze doniesienia

literaturowe wskazywały na udział ceramidu (Cer) w procesie indukowanej za pomocą prozapalnych cytokin typu Th1 (np. TNF- α , IFN- γ) apoptozy⁵³. Jednakże wewnątrzkomórkowy poziom Cer⁵⁴ nie korelował z cytotoksycznym efektem, będącym wynikiem synergistycznego działania obu cytokin^{55, 56}. W naszym projekcie założono, że uszkodzone w wyniku działania prozapalnych cytokin TNF- α i IFN- γ oligodendrocyty wydzielają egzosomy tj. mikropęcherzyki wielkości 40-90 nm, i że to one uczestniczą w mechanizmie prowadzącym do śmierci komórki. Badania przeprowadzono na modelu *in vitro* przy wykorzystaniu ludzkiej linii komórek gleju skąpowypustkowego (skąpodrzewiaka oligodendroglioma; HOG) [publikacja 3]. W celu wyjaśnienia synergistycznego działania obu cytokin przeprowadzono szczegółową analizę profilu bioaktywnych mediatorów sfingolipidowych komórek HOG traktowanych cytokinami TNF- α i IFN- γ oraz uwalnianych z tych komórek egzosomów. Analiza metodą tandemowej spektrometrii masowej HPLC-MS/MS pozwoliła na określenie głównych sfingolipidowych składników komórek HOG tj. C24:1-, C24-, i C16-Cer oraz – będących ich prekursorami – C16- i C24:1-dihydro (dh)Cer oraz C16- i C24:1-SM. Traktowanie komórek HOG cytokinami TNF- α i IFN- γ powodowało specyficzne zmiany zarówno w profilu komórkowym, jak i egzosomalnym. Choć istniała tendencja do wzrostu poziomu głównych Cer w komórkach traktowanych kombinacją cytokin, to jednak należy podkreślić, że najbardziej znaczący wzrost (ok. 2-krotny) zaobserwowano po upływie 48 godzin. Wbrew naszym oczekiwaniom, poziom Cer w komórce nie wzrastał w takim stopniu, jak w przypadku dhCer (ok. 3-krotnie w ciągu 48 godzin). Sugerowało to aktywną *de novo* syntezę Cer będącą sygnałem do indukcji śmierci komórek. Analiza SM nie wykazała statystycznie istotnego wpływu na główne sfingomielinowe składniki komórki. Natomiast w egzosomach wzrost poziomu Cer obserwowano już po 6 godzinach, w przeciwieństwie do komórkowego Cer, gdzie po tym samym czasie zarysowała się jedynie tendencja wzrostowa. Podwyższonemu poziomowi głównych rodzajów Cer, zwłaszcza C16-, C24- i C24: 1-Cer towarzyszył wzrost poziomu ich prekursorów, tj. C16-, C24- i C24:1-dhCer oraz C16-, C24- i C24:1-SM, co wskazywało na aktywną ścieżkę metaboliczną dhCer→Cer→SM. Porównano również względne poziomy komórkowych i egzosomalnych sfingolipidowych mediatorów, tj. Cer, dhCer i SM. Przedmiotem naszych badań był również samodzielny wpływ każdej z dwóch badanych cytokin oraz ich wspólne oddziaływanie na profil sfingolipidów (ang. *sphingolipids*, SLs). Oczywistym było, że dla każdego z badanych SLs widoczny był wspólny wzorzec zmian: podwyższenie poziomu SLs przez TNF- α , obniżenie poziomu SLs (lub brak efektu) w przypadku traktowania IFN- γ i znaczący wzrost poziomu SLs w przypadku działania obu cytokin. Zatem, to raczej egzosomalna dynamika Cer odpowiadała za cytotoksyczny efekt będący wynikiem synergistycznego działania obu cytokin. Dodatkowo, stymulacja egzogennym krótkołańcuchowym C6-Cer (metabolizowanym do długołańcuchowych Cer) oraz C16-Cer (proapoptotyczną komponentą egzosomów) wskazywała na

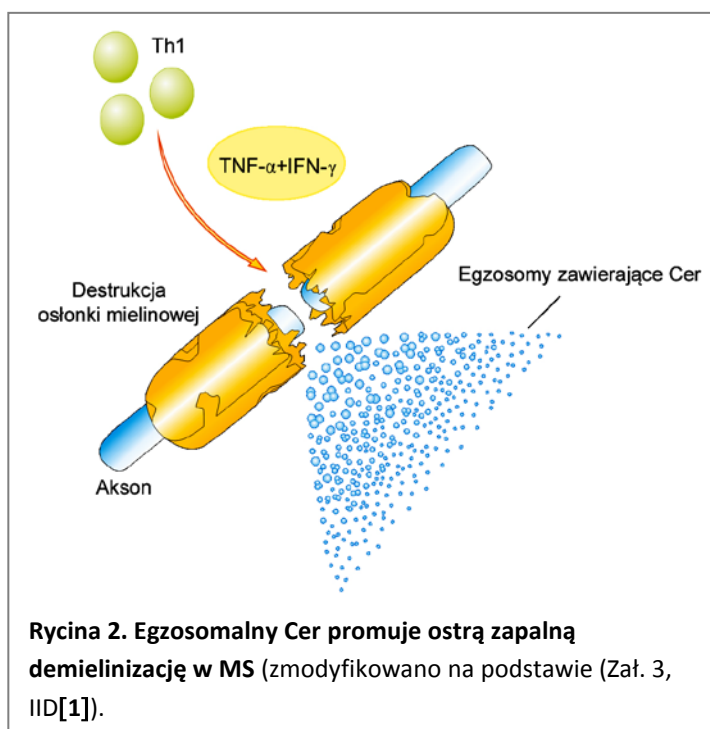
udział tych rodzajów Cer w mechanizmie synergistycznego działania $\text{TNF-}\alpha$ i $\text{IFN-}\gamma$ w komórkach HOG. Tak więc, zastosowanie egzogennych Cer potwierdziło rolę bioaktywnych sfingolipidowych mediatorów w mechanizmie prowadzącym do śmierci komórki.

W oparciu o uzyskane wyniki można wysunąć wniosek, że potencjalne mechanizmy wpływające na podatność oligodendrocytów na autoimmunologiczny atak wiążą się z prozapalnymi i proapoptotycznymi właściwościami Cer. Prawdziwość tej hipotezy wydają się potwierdzać najnowsze badania dostarczające dowodów na toksyczną rolę Cer *per se* w badaniach modelowych i klinicznych. Akumulację Cer wykazano *in vitro*, na modelu zwierzęcym choroby i zaobserwowano w plakach MS. Doniesienia wskazywały na wzrost poziomu C16:0- i C18:0-Cer⁵⁷ oraz C18:0-, C18:1-, C24:0- i C24:1-Cer⁵⁷⁻⁵⁹. Niedawno odnotowano również, że C16:0- i C24:0-Cer występują w CSF u chorych na MS⁶⁰. Nasze wstępne dane dotyczące analizy sfingolipidowego profilu *ex vivo* w tkankach pobranych *post mortem* od osób z klinicznie rozpoznanym MS z plak przewlekłych, wskazują na znaczący wzrost głównych rodzajów dhCer (C16-, C24- i C24:1-dhCer) oraz istotny spadek głównych rodzajów SM (C24- i C24:1-SM) w porównaniu z „prawidłowo wyglądającą istotą białą” (ang. *normal appearing white matter*, NAWM) pochodzącą od osób z grup referencyjnych (Zał. 3, IIIB[1]).

Warto wspomnieć, że Cer pełnią zasadniczą rolę w metabolizmie SLs. Regulacja ich poziomów jest niezwykle złożona, ponieważ ich metabolizm obejmuje biosyntezę *de novo*, acylację sfingozyny (ścieżka ratunkowa), hydrolizę SM oraz degradację GSLs (Zał. 3, IIA[3]). Ten szlak metaboliczny stwarza możliwość znalezienia punktów uchwytu dla potencjalnych nowych terapii⁶¹. Uzyskane przez nas wstępne dane sugerują, iż podwyższony poziom Cer może wynikać z zaburzonej ekspresji zarówno desaturazy dhCer, jak i sfingomielinazy (Zał. 3, IIIB[1]).

Reasumując, egzosomalne Cer mogą mieć istotne następstwa patofizjologiczne.

Najprawdopodobniej uwolnione, w wyniku działania stresu lub stymulacji cytokinami, z oligodendrocytów i/lub ich prekursorów, w warunkach *in vivo* mogą przekazywać sygnał prowadzący do śmierci komórki i promować zapalną demielinizację w CNS (Ryc. 2).



Rycina 2. Egzosomalny Cer promuje ostrą zapalną demielinizację w MS (zmodyfikowano na podstawie (Zał. 3, IID[1]).

Badania przeprowadzone przez nasz zespół przemawiają za tym, że egzosomalne Cer mogą stać się w przyszłości markerem diagnostycznym lub prognostycznym w MS. Ponadto zmodyfikowane genetycznie egzosomy mogłyby znaleźć zastosowanie w nowych strategiach terapeutycznych, wymagających transportu substancji czynnych przez barierę krew-mózg.

Remisja choroby

Limfocyty T o znaczeniu immunoregulacyjnym

Ze względu na bardzo złożony i heterogeny obraz immunopatologii MS, sugeruje się obecność w tej chorobie nieprawidłowości na poziomie immunoregulacyjnym⁶². Mogą one być wynikiem zaburzeń funkcji oraz wzajemnych interakcji wielu składników komórkowych układu odpornościowego, a zwłaszcza regulatorowych limfocytów T (ang. *regulatory T cells*, Treg)⁶³. Istnieje kilka regulatorowych populacji limfocytów T uczestniczących w supresji i zapobieganiu rozwojowi MS. Najważniejszą rolę w tej grupie komórek przypisuje się pochodzącym z grasicy limfocytom nTreg⁶⁴ (ang. *natural Treg*) o fenotypie CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ oraz indukowanym w obrębie obwodowego układu odpornościowego iTreg⁶⁵ (ang. *induced Treg*), których przykładem są limfocyty Tr1 oraz Th3.

Funkcję regulatorową mogą również pełnić komórki Th2 wydzielające IL-4, IL-5 i IL-13. W przeciwieństwie do komórek Th1/Th17 uczestniczą one w modulowaniu efektów zapalnych⁶⁶. Obecne doniesienia sugerują, że zaostrzenie kliniczne (rzut choroby) stymulują prozapalne komórki Th1 i Th17, podczas gdy przeciwzapalne komórki Th2 i komórki nTreg sprzyjają całkowitemu lub częściowemu ustąpieniu objawów klinicznych (remisja choroby)⁴⁷.

Obok wyżej wymienionych subpopulacji limfocytów CD4⁺ regulatorowe funkcje przypisuje się również limfocytom T CD8⁺CD122⁺ oraz komórkom NKT⁶⁷.

Komórki NKT – jako pomost pomiędzy odpornością wrodzoną i nabytą w MS. Rozróżnianie antygenów własnych i obcych przez komórki immunokompetentne umożliwia skuteczną odpowiedź układu odpornościowego na patogeny i zapobiega rozwojowi procesów autoimmunologicznych⁶⁸. Regulacja odpowiedzi immunologicznej przebiega zarówno w obrębie obwodowych narządów limfatycznych (tolerancja obwodowa), jak i w CNS (tolerancja centralna). Układ odpornościowy rozwinął szereg mechanizmów tolerancji immunologicznej, które obejmują m.in. delecję klonalną, sekwestrację antygeny, anergię limfocytów oraz aktywną supresję⁶⁹. Pogłębiona znajomość tych mechanizmów ma kluczowe znaczenie, ponieważ przywrócenie stanu tolerancji jest ważnym celem terapii chorób autoimmunizacyjnych.

Komórki NKT stanowią przedmiot szczególnego zainteresowania, gdyż w odróżnieniu od konwencjonalnych limfocytów T wiążących peptydy⁷⁰ rozpoznają własne lub obce antygeny lipidowe,

prezentowane przez cząsteczkę CD1d [publikacja 4]. Komórki te stanowią niejednorodną subpopulację limfocytów T, wykazującą ekspresję markerów charakterystycznych zarówno dla konwencjonalnych limfocytów T, takich jak TCR (ang. *T cell receptor*), jak i komórek NK (np. CD56, CD94, CD161). Wyróżnia się dwa podtypy komórek NKT. Większość z nich charakteryzuje się bardzo ograniczonym repertuarem receptorów TCR kodowanych przez niezmiennie geny $V\alpha 24J\alpha 18$ łańcucha α i geny $V\beta 11$ łańcucha β (ang. *invariant TCR*, iTCR) u ludzi. Określane są one mianem „klasycznych” komórek NKT (ang. *invariant NKT*, iNKT) bądź komórkami NKT typu I. Populacja ta charakteryzuje się również zdolnością odpowiadania na stymulację, pochodzącą z gąbek morskich *Agelas mauritanus*, α -GalCer. Komórki NKT typu II (ang. *non-iNKT cells*), nazywane również „nieklasycznymi” NKT, nie posiadają iTCR i wykazują obecność znacznie większej liczby różnych receptorów TCR. Aczkolwiek komórki iNKT stanowią niewielki odsetek limfocytów T we krwi obwodowej, odgrywają jednak bardzo istotną rolę w odpowiedzi autoimmunologicznej. Ich działanie jest natychmiastowe i przyczynia się do pobudzenia innych komórek układu odpornościowego, począwszy od komórek NK, konwencjonalnych limfocytów T $CD4^+$ lub $CD8^+$, komórek dendrytycznych a skończywszy na limfocytach B. Komórki NKT mogą być aktywowane na dwa sposoby: bezpośrednio poprzez stymulację lipidowymi antygenami prezentowanymi przez cząsteczkę CD1d bądź pośrednio poprzez cytokiny produkowane przez cząsteczki APCs. W bezpośrednim mechanizmie bierze udział szereg lipidowych i glikolipidowych antygenów prezentowanych przez CD1d, które aktywują komórki iNKT do różnych funkcji w zależności od ich cytokinowego mikrośrodowiska. Duża różnorodność cząsteczek reagujących z receptorem iNKT definiuje iTCR jako receptor PRR. Lista antygenów rozpoznawanych przez receptory iTCR, będących w kompleksie z CD1d, jest długa i w dalszym ciągu jeszcze uzupełniana. Obok wspomnianego już syntetycznego liganda α -GalCer, najlepiej poznanego i najbardziej skutecznego aktywatora komórek iNKT, obejmuje ona zarówno egzogenne ligandy pochodzenia bakteryjnego, jak i endogenne autoantygeny [publikacja 4].

Komórki NKT mogą pełnić funkcje regulatorowe, co zostało dowiedzione w badaniach modelowych⁷¹⁻⁷³, jednakże ich funkcja w MS nie jest w pełni poznana. W celu dokładniejszego sprecyzowania roli komórek NKT w tym schorzeniu dokonano analizy profilu ekspresji powierzchniowej komórek NK i iNKT we frakcji jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (ang. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs), ze szczególnym uwzględnieniem ekspresji receptorów komórek NK (CD56, CD161 i CD94) oraz receptora iTCR. Wcześniejsze obserwacje poczynione w zespole Hogana⁷⁴ wskazywały na obniżony odsetek komórek T wykazujących ekspresję CD161 i CD94, odpowiednio u pacjentów z PPMS i SPMS w stosunku do osób zdrowych (7,2% vs. 12,5%; $p=0,04$ i 4,9% vs. 12,1%; $p=0,04$). Natomiast ekspresja CD56 we wszystkich badanych podgrupach MS oraz w grupie osób zdrowych kształtowała się na tym samym poziomie. W przeciwieństwie do

ekspresji CD161 i CD94 zaobserwowano podwyższony odsetek komórek T wykazujących ekspresję receptora iTCR w porównaniu do osób zdrowych (0,71% vs. 0,41%; $p=0,02$) we frakcji PBMCs *ex vivo*. Wykazano również korelację z manifestacją kliniczną MS; pacjenci w podgrupie RRMS cechowali się znacznie wyższym poziomem ekspresji receptora iTCR. Obserwacje te nabierają szczególnego znaczenia w świetle danych na temat funkcji komórek NK i NKT, sugeruje się bowiem, że uczestniczą one w nadzorze immunologicznym. Zmiany w proporcjach komórek NK i komórek iNKT w MS mogą mieć zatem swoje następstwa kliniczne. Zmniejszona liczba komórek NK u pacjentów manifestujących się postępującymi podtypami MS może odzwierciedlać nieefektywne hamowanie odpowiedzi autoimmunologicznej skutkującej postępującą neurodegeneracją w MS. Z kolei zwiększona liczba komórek iNKT we krwi obwodowej pacjentów z MS może sugerować potencjalną rolę tych komórek w zapobieganiu chorobom autoimmunizacyjnym.

W celu określenia znaczenia funkcjonalnego obserwowanych *ex vivo* zmian ilościowych komórek iNKT krwi obwodowej, wyniki uzupełniono o kolejną analizę profilu ekspresji powierzchniowej komórek NK, NKR⁺ oraz komórek iNKT w warunkach bez stymulacji, lub pod wpływem stymulacji mieszaniną FMC-5 i FMC-7 oraz oczyszczonym FMC-7 [publikacja 5]. Uzyskane dane porównano z odpowiedzią na najsilniejszy aktywator iNKT, tj. α -GalCer. Okazało się, że zarówno mieszanina FMC-5 i FMC-7 ($1,4 \pm 0,4\%$; $p=0,04$), jak i oczyszczony FMC-7 ($2,7 \pm 1,9\%$; $p=0,02$) oraz α -GalCer ($7,4 \pm 1,6\%$; $p=0,00045$) aktywowały komórki iNKT. Co ważniejsze, odpowiedź na GSLs, wyrażająca się ekspansją komórek, była specyficzna jedynie dla komórek iNKT (CD3⁺V α 24J α 18⁺). Nie stwierdzono zmian w populacji komórek NK (CD3⁻CD56⁺) ani komórek T NKR⁺ (CD3⁺CD56⁺ bądź CD3⁺CD161⁺ bądź CD3⁺CD94⁺) po stymulacji z żadnym z testowanych GSLs. W szczególności, oczyszczony FMC-7 indukował proliferację i wydzielanie cytokin typu Th1: TNF- α ($p=0,008$), IFN- γ ($p=0,008$), IL-1 β ($p=0,008$), typu Th2: IL-6 ($p=0,02$), IL-10 ($p=0,03$) oraz typu Th17: IL-17 ($p=0,03$) w grupie osób zdrowych. Z kolei α -GalCer preferencyjnie indukował produkcję cytokin prozapalnych typu Th1, m.in. TNF- α ($p=0,03$), IFN- γ ($p=0,03$) oraz IL-2 ($p=0,03$) obok jednej tylko cytokiny typu Th2, tj. IL-6 ($p=0,008$) [publikacja 5]. Nasz molekularny model sugerował, że konformacja poli-acetylowanej reszty galaktozy w FMC-7 pasuje do miejsca wiążącego receptora iTCR, co skutkowało inicjacją aktywacji komórek iNKT. Jest to zgodne z aktualną koncepcją "glikolipidowego modelu" w synapsie CD1-glikolipid-iTCR. Drugą ważną obserwacją był fakt, że komórki iNKT z krwi obwodowej pacjentów z MS, nie odpowiadały na stymulację α -GalCer, z wyjątkiem produkcji TNF- α ($p=0,03$). Podobne zjawisko obserwowano w przypadku stymulacji endogennym glikosfingolipidowym antygenem FMC-7, gdzie odnotowano jedynie nieistotną statystycznie sekrecję cytokin TNF- α , IL-10 i IL-17, wskazując tym samym na stan anergii komórek iNKT [publikacja 5].

Przyczyną obserwowanej hiporeaktywności, czyli braku odpowiedzi immunologicznej, komórek iNKT może być ich wcześniejszy kontakt z glikolipidowymi bądź glikosfingolipidowymi antygenami. Zjawisko anergii prawdopodobnie jest skutkiem nasycenia receptora iTCR glikolipidowym ligandem pochodzenia bakteryjnego podczas infekcji bądź GSLs, uwolnionymi z mieliny w trakcie procesu demielinizacyjnego. Wysoce prawdopodobnym jest, że w tym przypadku ma miejsce rywalizacja na poziomie wiązania antygeny do receptora iTCR. Postulowano, że glikolipidowe czynniki patogenne wykazują większe powinowactwo do iTCR podczas gdy endogenne mielinowe GSLs wiążą się słabiej. Związanie antygeny inicjuje aktywację komórek iNKT, która w zależności od cytokinowego środowiska może skutkować: i) procesem zapalnym w CNS zależnym od komórek Th1, ii) odpowiedzią przeciwważną mediowaną przez komórki Th17, bądź iii) supresją indukowaną za pośrednictwem komórek iTreg. Ten nieco uproszczony schemat obrazuje wpływ działania cytokin i innych mechanizmów kontrolnych oraz pozwala uwiarygodnić hipotezę „transformacji procesu zależnego od infekcji do samodestrukcyjnego ataku z utratą tolerancji dla endogennych lipidowych antygenów mieliny”. Interpretację tę przedstawiono w pracy przeglądowej (Załącznik 3, IID[3]).

Zupełnie nową obserwacją było stwierdzenie u pacjentów z MS hiporeaktywności komórek iNKT, niewykazujących autoagresji przeciwko endogennym GSLs [publikacja 5]. Co więcej, stan anergii po stymulacji autoantygenem FMC-7 może mieć znaczące implikacje kliniczne, zgodnie z teorią antygenowo swoistej terapii chorób autoimmunizacyjnych. Endogenne ligandy GSLs, takie jak FMC-7, mogłyby bowiem uczestniczyć w zwalczaniu stanu zapalnego w CNS i wspomagać proces naprawczy mieliny. W związku z tym, że α -GalCer niweluje objawy choroby, co wykazano *in vivo* na modelu EAE (ang. *experimental autoimmune encephalomyelitis*)⁷⁵ i wspiera remielinizację. Rola FMCs w podobnym mechanizmie w MS wydaje się wysoce prawdopodobna. Doniesiono również, że stymulacja limfocytów T za pomocą sGalCer *in vitro* prowadziła do, będącego konsekwencją stanu anergii, zahamowania różnicowania i proliferacji komórek Th17 oraz zmniejszenia objawów klinicznych choroby⁷⁶. Dokładniejsze poznanie i zrozumienie molekularnych podstaw obserwowanej anergii limfocytów T oraz udziału innych komórek i cytokin w mechanizmach leżących u podstaw zaburzonej odpowiedzi immunologicznej w MS może przyczynić się w przyszłości do opracowania bardziej efektywnych strategii leczenia.

Progresja choroby

Mikroglej M1

Równie istotnym elementem w patologii MS, obok ostrej i przewlekłej demielinizacji, jest uszkodzenie aksonalne i neuronalne, odpowiadające za utrwalony i postępujący deficyt

neurologiczny. Oznaki uszkodzenia aksonalnego występującego we wczesnych fazach MS, stwierdza się w ostrych plakach demielinizacyjnych, zwłaszcza w sąsiedztwie makrofagów, oraz w plakach przewlekłych, jak i w „prawidłowo wyglądającej istocie białej”^{77, 78}. Początkowo ubytek aksonalny przebiega bezobjawowo, jednak z czasem dochodzi do zaburzeń mechanizmów wyrównawczych i deficyt neurologiczny objawia się w postaci choroby o postępującym przebiegu. Trwają intensywne badania nad mechanizmami, w wyniku których dochodzi do tego rodzaju uszkodzeń⁷⁹. Obecnie uważa się, że przyczyną postępującej neurodegeneracji są nadmiernie pobudzone komórki mikrogleju⁸⁰, stanowiące od 5 do 20% wszystkich komórek glijowych w CNS. Większość tej populacji stanowi mikroglej rezydujący w mózgu od wczesnych faz rozwoju prenatalnego. Część obecnego w CNS mikrogleju rekrutuje się z komórek obwodowych: monocytów i makrofagów, które napływają do CNS w wyniku urazów lub w czasie rozwoju reakcji zapalnej.

Powszechnie wiadomo, że komórki mikrogleju mogą być aktywowane na dwa sposoby, skutkując odpowiednio powstaniem formy klasycznej M1 lub alternatywnej M2. Udział pobudzonych klasycznie komórek mikrogleju M1 wydaje się bardzo ważny z racji uwalniania prozapalnych cytokin^{81, 82}, enzymów proteolitycznych^{83, 84} oraz generowania reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS)⁸⁵ i tlenu azotu⁸⁶, których destrukcyjny wpływ nie pozostawia wątpliwości. Komórki mikrogleju biorą udział w utrzymywaniu prawidłowej funkcji neuronów, z którymi pozostają w ścisłym związku funkcjonalnym⁸⁷. Długotrwała i samopowielająca się reakcja mikrogleju na uszkodzenie komórek neuronalnych prowadzi do „reaktywnej mikroglejozy”⁸⁸. Wykazano, że komórki mikrogleju odgrywają zasadniczą rolę w uszkodzeniach neuronów prowadzących do powstawania plak demielinizacyjnych zlokalizowanych głównie w korze mózgowej. Opisano związek komórek mikrogleju z uszkodzeniem kory mózgowej w postępującym MS, jak również z zaburzeniami transmisji synaptycznej na modelu EAE^{89, 90}. Liczne badania *in vitro* i *in vivo* dowiodły, że zahamowanie aktywności mikrogleju zmniejsza neurotoksyczność i zwiększa przeżywalność neuronów.

Kalpaina 1 i 2

Związana z progresją zaburzeń neurologicznych aktywacja mikrogleju M1 może występować w połączeniu z innymi czynnikami, m.in. aktywacją kalpainy 1 i 2. Kalpainy to nielizosomowe proteazy cysteinowe występujące w cytoplazmie komórek organizmów eukariotycznych. Nazwa kalpaina jest skrótem wywodzącym się od angielskich słów *calcium-activated papain-like cystein protease* (*calpain*). Obecność kalpain została po raz pierwszy zidentyfikowana w mózgu i mięśniach szczura i od tej pory stały się one obiektem intensywnych badań w kontekście ich znaczenia fizjologicznego oraz roli w rozlicznych patologiach. W zależności od miejsca występowania, kalpainy są powszechnie klasyfikowane jako „wszędobylskie” (ang. *ubiquitous*) oraz tkankowo-swoiste. Najbardziej znane, tzw.

„klasyczne” kalpains, kalpaina 1 (μ -kalpaina) i kalpaina 2 (m-kalpaina) są powszechnie ekspresjonowane w komórkach CNS⁹¹. Ich klasyfikacja zależy od stężenia jonów wapnia wymaganych do pełnej aktywności proteolitycznej *in vitro*. I tak, μ -kalpaina wymaga 2-80 μ M Ca^{2+} , podczas gdy m-kalpaina 0,2-0,8 mM Ca^{2+} . Fizjologiczne znaczenie kalpain wydaje się wielce istotne z racji ogromnej liczby zidentyfikowanych dla nich substratów. Zarówno μ -kalpaina, jak i m-kalpaina wykazują tę samą specyficzność substratową. W grupie ponad 100 powszechnie uznanych preferowanych substratów kalpain można wyróżnić: białka cytoszkieletu komórki, białka błonowe, cytokiny, czynniki transkrypcyjne, kinazy białkowe i fosfatazy oraz białka soczewki ocznej. Pomimo tak licznej grupy substratów, nie udało się jasno określić cech strukturalnych charakteryzujących wszystkie hydrolizowane przez kalpains białka lub peptydy. Obserwuje się raczej powinowactwo do trzeciorzędowej struktury substratów niż do ich ściśle określonej sekwencji aminokwasowej. Na uwagę zasługuje fakt, iż kalpains nie działają na większość swoich substratów destrukcyjnie. Uczestniczą one w niekompletnej proteolizie, która często prowadzi do aktywacji substratu.

W warunkach fizjologicznych stężenie jonów Ca^{2+} wynosi 50-100 nM i jest niewystarczające do uaktywnienia kalpain. Postuluje się możliwość istnienia dwóch mechanizmów prowadzących do aktywacji kalpain *in vitro*. W pierwszym, aktywacja, poza przyłączeniem jonów Ca^{2+} , wymaga zmian strukturalnych w obrębie domen związanych z cięciem proteolitycznym enzymu, odsłaniającym miejsce aktywne w obrębie podjednostki katalitycznej. W drugim, wysoki wewnątrzkomórkowy poziom jonów Ca^{2+} stymuluje translokację nieaktywnej kalpains z cytozolu do błony komórkowej. Następnie, bez autolizy i przy fizjologicznym stężeniu jonów Ca^{2+} , dochodzi do aktywacji kalpains w obecności efektorów błonowych takich jak fosfolipidy i białkowych aktywatorów kalpain. Po zaktywowaniu kalpaina dyfunduje z powrotem do cytozolu. Niekontrolowanej proteolizie kalpainowych substratów zapobiega obecność kalpastatyny – specyficznego endogennego inhibitora aktywnej kalpains. Kalpastatyna ulega aktywacji na skutek ograniczonej proteolizy dokonanej przez kalpainę, w warunkach odpowiedniego stężenia jonów Ca^{2+} . Zaktywowana w ten sposób kalpastatyna zyskuje zdolność do inhibicji kompetencyjnej kalpain. Aktywacja systemu kalpaina-kalpastatyna odbywa się zatem na drodze wzajemnych sprzężeń zwrotnych. Równowaga ta musi być ściśle kontrolowana, gdyż nadmiar jednego ze składników systemu prowadzi do różnego rodzaju procesów patologicznych. Nieprawidłowe funkcjonowanie systemu kalpaina-kalpastatyna skutkujące zmienioną ekspresją „klasycznych” kalpain stwierdzono m.in. w MS^{92, 93}, chorobie Alzheimera⁹⁴, Parkinsona⁸³ oraz innych schorzeniach⁹⁵.

Interakcja odporności wrodzonej i nabytej: autoreaktywne limfocyty T i komórki mikrogleju jako główne czynniki patologiczne promujące postępującą fazę MS. W świetle przeprowadzonych ostatnio badań przypuszcza się, że uszkodzenie aksonów i neuronów w chorobach demielinizacyjnych

takich jak MS, jest procesem wieloczynnikowym będącym konsekwencją nakładania się na siebie wielu patologicznych procesów. Postuluje się, iż jednym z najbardziej prawdopodobnych mechanizmów odpowiedzialnych za apoptozę komórek nerwowych w CNS jest znaczny wzrost stężenia jonów Ca^{2+} w aksoplazmie, tzw. „przeładowanie jonami wapnia”, które powoduje aktywację szeregu enzymów proteolitycznych, m.in. kalpainy. Uważa się, że neurodegeneracja może przebiegać na drodze bezpośredniej lub pośredniej. Neurodegeneracja bezpośrednia polega na uszkodzeniu neuronów przez kontaktujące się z nimi, infiltrujące CNS, autoreaktywne limfocyty T, monocyty i makrofagi oraz pełniące funkcję rezydującego makrofagowego systemu obronnego w CNS, komórki mikrogleju. Komórki te wydzielają w ogniskach zapalnych szereg mediatorów (prozapalne cytokiny, ROS, NO). Nie można wykluczyć, że w wyniku toczącego się w tkance nerwowej procesu zapalnego dochodzi także do wtórnej neurodegeneracji.

Wieloletnie prace badawcze prowadzone w zespole Banika wskazywały na: i) udział kalpainy w aktywacji i migracji komórek $\text{T}^{96, 97}$, ii) rolę kalpainy w zaburzeniu równowagi odpowiedzi typu Th1/Th2^{98, 99}, iii) nadekspresję kalpainy w zaktywowanych komórkach CNS, m.in. mikrogleju¹⁰⁰, iv) udział kalpainy w degeneracji tkanki w EAE i MS^{92, 93} oraz v) pośrednictwo kalpainy w szlakach sygnałowych prowadzących do apoptozy i nekrozy¹⁰¹. Dane te stanowiły przesłankę do postawienia hipotezy, że: *„aktywacja kalpainy odgrywa kluczową rolę w immunozależnej patologii MS, a jej modulacja prowadzi do remisji choroby, niwelując zarówno proces zapalny, jak i neurodegeneracyjny”*. Hipotezę tę sprawdzano *in vitro* na dwóch modelach badawczych [publikacja 6]. W modelu ludzkim limfocyty pomocnicze Th1/Th17 stanowiły czynnik inicjujący zapalną demielinizację, zgodnie z powszechnie uznanym poglądem na temat roli limfocytów T CD4^+ w inicjowaniu MS. Źródłem autoreaktywnych limfocytów T były PBMCs pochodzące od pacjentów z MS stymulowane przeciwciałami anty-CD3/anty-CD28 (PBMCs_{Act}) na podstawie faktu potwierdzonej uprzednio w zespole Banika produkcji prozapalnych cytokin Th1/Th17¹⁰². Ekspozycja płodowych ludzkich neuronów kory mózgowej na PBMCs_{Act} prowadziła do zmniejszenia ich żywotności [publikacja 6]. Efektu tego nie obserwowano gdy neurony uprzednio traktowano inhibitorem kalpainy, kalpeptyną. Aktywność uwalnianej pozakomórkowo z neuronów kalpainy monitorowano zarówno w hodowlach traktowanych PBMCs, jak i PBMCs_{Act}. Okazało się, że we krwi obwodowej jej aktywność wzrastała nawet bez aktywacji limfocytów T *in vitro*, wskazując najprawdopodobniej na obecność autoreaktywnych limfocytów T na obwodzie u pacjentów z MS. Aktywność kalpainy obniżała się, kiedy neurony były traktowane PBMCs_{Act} w obecności kalpeptyny. Ekspozycja neuronów na PBMCs_{Act} skutkowała podwyższoną produkcją ROS (1,9 krotnie; $p < 0,001$). Próba modulacji aktywności kalpainy, jej inhibitorem – kalpeptyną, w równoległe prowadzonych hodowlach niwelowała te efekty. Nadaktywność kalpainy korelowała z silnie podwyższoną aktywnością kaspazy-8, -9 i -3. Aktywacja kaspazy-8 wskazywała na udział zewnętrznego szlaku apoptotycznego

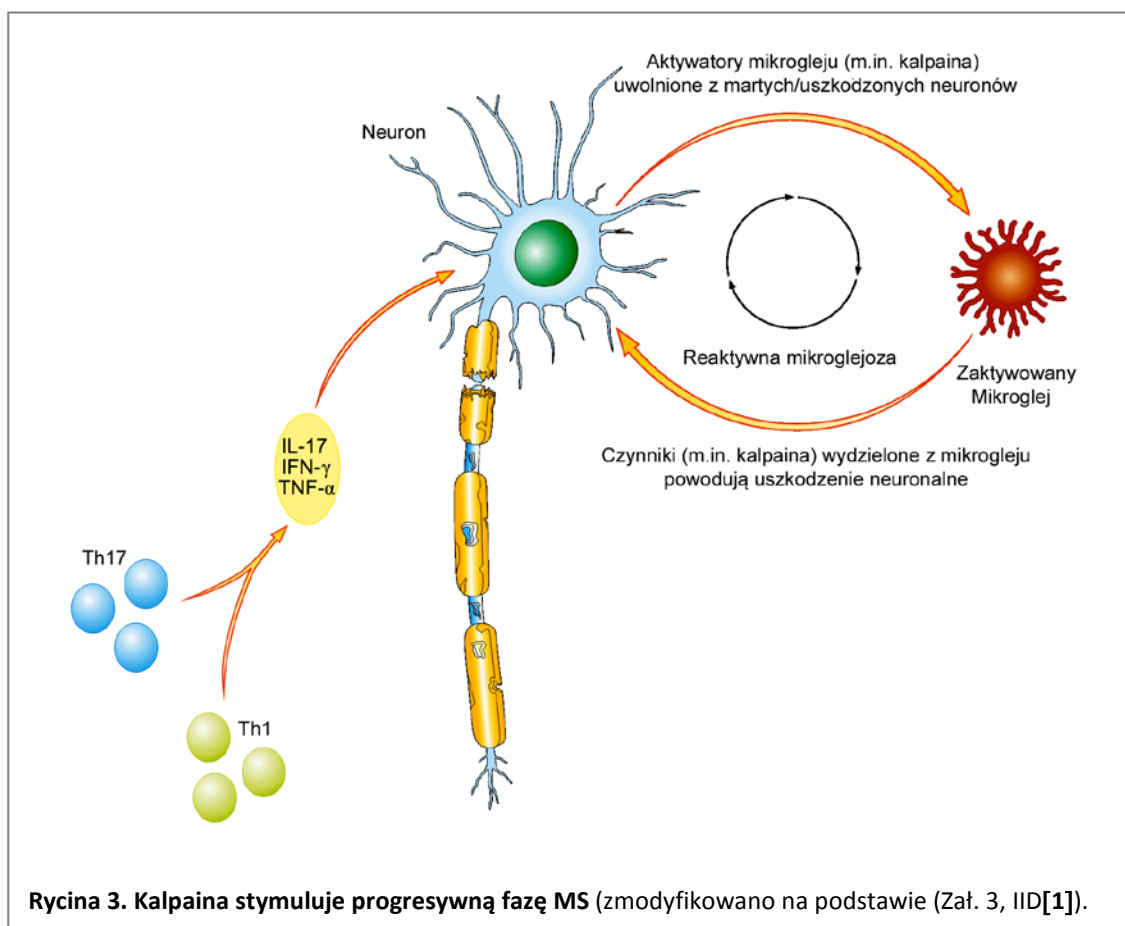
przebiegającego za pośrednictwem receptorów śmierci, podczas gdy aktywacja kaspazy-9, a następnie kaspazy-3 sugerowała udział wewnętrznego szlaku przebiegającego z udziałem mitochondriów. Modulacja kalpajny za pomocą kalpeptyny częściowo blokowała kaspazy- 8, -9 i -3 **[publikacja 6]** potwierdzając pogląd, że neuroprotekcja jest, przynajmniej po części, spowodowana zahamowaniem zarówno szlaku przebiegającego za pośrednictwem receptorów śmierci, jak i szlaku mitochondrialnego, obu związanych z aktywnością kalpajny. Warto podkreślić fakt, że aktywna kalpaina może dokonać zarówno ograniczonej proteolizy aktywując kaspazę-3 stymulując proces apoptozy¹⁰³, jak też całkowicie zdegradować tę kaspazę, hamując bądź uniemożliwiając apoptozę¹⁰⁴.

W świetle naszych badań można stwierdzić, że w warunkach *in vitro* aktywacja kalpajny, stres oksydacyjny i zaburzenia czynności mitochondriów są kluczowymi czynnikami powodującymi uszkodzenie ludzkich neuronów. W związku z tym można przypuszczać, że proces neurodegeneracji może być następstwem: aktywacji kalpajny, generowania ROS, dysfunkcji mitochondriów i aktywacji kaskady kaspaz. W dalszym etapie próbowano wyjaśnić, czy uwolnione do medium hodowlanego z uszkodzonych i/lub martwych neuronów toksyczne mediatory uszkadzają pierwszorzędowe komórki ludzkiego mikrogleju **[publikacja 6]**. Wyniki wskazywały, że traktowanie mikrogleju medium kondycjonowanym przez hodowlę neuronów wpływało na obniżenie żywotności komórek oraz powodowało wzrost zarówno aktywności kalpajny (2,9 krotny; $p<0,01$), jak i kaspazy-3 (2,5 krotny; $p<0,01$). Towarzyszyła temu wzmożona produkcja ROS (1,7 krotna; $p<0,01$) i NO (1,8 krotna; $p<0,001$). Modulacja kalpajny przez kalpeptynę prowadziła do zahamowania cytotoksycznych efektów, skutkując zwiększeniem przeżywalności mikrogleju. Może to sugerować, że wydzielana przez ludzkie neurony kalpaina jest istotnym mediatorem stymulującym uszkodzenie komórek mikrogleju.

Aby wyjaśnić wpływ aktywowanych komórek mikrogleju na żywotność innych komórek CNS, zbadano efekt działania wydzielanych do medium hodowlanego mediatorów na żywotność dziewiczych ludzkich neuronów. Badania te potwierdziły rolę kalpajny jako kluczowego mediatora uwalnianego ze zaktywowanego mikrogleju. Po ekspozycji ludzkich neuronów na medium, pochodzące z hodowli mikrogleju, odnotowano zwiększoną aktywność wydzielanej pozakomórkowo kalpajny (3,1 krotnie; $p<0,01$). Zmniejszona żywotność neuronów była związana ze znaczącym wzrostem produkcji ROS (4,2 krotnym; $p<0,01$), sugerując udział stresu oksydacyjnego w tym neurodegeneracyjnym procesie. Zgodnie z oczekiwaniami aktywność kluczowego „gracza” w procesie apoptozy – kaspazy-3 była również podwyższona (3,1 krotnie; $p<0,01$). Konsekwentnie, ekspozycja dziewiczych neuronów, uprzednio traktowanych kalpeptyną, na medium kondycjonowane przez mikroglej, prowadziła do zahamowania neurotoksycznych efektów i zmniejszenia odsetka komórek apoptotycznych.

Przeprowadzone na modelu ludzkim badania [publikacja 6] potwierdziły kooperację autoreaktywnych limfocytów T i komórek mikrogleju¹⁰⁵, zgodnie z powszechnie uznaną opinią, że są to główne czynniki promujące zapalną demielinizację i neurodegenerację w MS¹⁰⁶. Istnienie takiej samej sekwencji zdarzeń potwierdzono także na pierwszorzędowych hodowlach szczurzych neuronów i komórek mikrogleju pochodzących z kory mózgowej. Obecność kalpains 1 i kalpains 2 w progresywnym przebiegu MS została ostatecznie uwiarygodniona podczas próby modulacji ich aktywności zarówno przy zastosowaniu inhibitorów (kalpeptyny i SNJ-1945), jak i wyciszenia genów obu kalpain techniką siRNA (ang. *small interfering RNA*) [publikacja 6].

Podsumowując, badania te przyczyniły się do poszerzenia dotychczasowej wiedzy na temat możliwych mechanizmów odpowiedzialnych za progresję MS. Na podstawie dwóch modeli *in vitro* – ludzkiego i szczurzego – wykazano, że kalpaina jest kluczowym mediatorem stymulującym samopowielającą się reaktywną mikrogleję prowadzącą do uszkodzenia neuronów. Uwolnione po uszkodzeniu neuronów mediatory, m. in. zidentyfikowana kalpaina, aktywowały komórki mikrogleju co skutkowało generowaniem ROS i NO, a te z kolei działały toksycznie na dziewicze neurony prowadząc do ich apoptozy. Ta dwukierunkowa interakcja pomiędzy neuronami i komórkami mikrogleju (Ryc. 3) wydaje się istotna dla zrozumienia nakładających się na siebie procesów zapalnej demielinizacji i postępującej neurodegeneracji w progresywnym przebiegu MS. Warto nadmienić, że komórki mikrogleju mogą także pełnić funkcje neuroprotekcyjne. Powszechnie wiadomo, że alternatywnie aktywowany mikroglej M2 bierze udział w promowaniu i odnowie neuronów, a także



oligodendrocytów, co wskazuje zarówno na jego czynny udział w neuroregeneracji, jak i sugeruje istotny wpływ na procesy remielinizacji^{107, 108}. Zatem „przełączenie” destrukcyjnej funkcji mikrogleju na neuroprotekcijną mogłoby być korzystne w zapobieganiu chronicznej demielinizacji, utracie aksonów i uszkodzeniu neuronów, zapobiegając tym samym progresji choroby. Konwersja między różnymi fenotypami wydaje się być teraz krytycznym następnym krokiem pozwalającym na wyjaśnienie czynników inicjujących lub promujących takie zmiany. Modulacja aktywacji mikrogleju w celach terapeutycznych – zapobieganie szkodliwym działaniom przy równoczesnym zachowaniu ich funkcji ochronnych – wydaje się być właściwym kierunkiem dalszych badań. Ponadto nasze obserwacje pociągają za sobą możliwość potencjalnego zastosowania zarówno w strategii profilaktycznej, jak i terapeutycznej. Ocena ekspresji kalpajny może się przyczynić do odkrycia nowych czynników ryzyka w patomechanizmie MS, zaś próba modulacji jej aktywności może stanowić nowy punkt uchwytu w terapii pacjentów z tą jednostką chorobową.

W kolejnej części autoreferatu przedstawiono streszczenie wybranych do oceny publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego.

1. **M. Podbielska** and E.L. Hogan. Molecular and immunogenic features of myelin lipids: incitants or modulators of multiple sclerosis? *Mult. Scler.* 15(9), 1011-1029, 2009.

W niniejszej pracy przeglądowej opisano stan wiedzy na temat molekularnych podstaw MS, ze szczególnym uwzględnieniem: i) organizacji i dostępności lipidów, ich rozmieszczenia w otocze mielinowej w CNS oraz właściwości fizykochemicznych, ii) charakterystyki struktur lipidowych mielin oraz iii) funkcji lipidów zależnych od struktury, a zwłaszcza relacji istotnych dla mechanizmów w MS. Doniesienia literaturowe wskazywały, że antylipidowe przeciwciała mogą odgrywać rolę biomarkerów i sugerowały ich przydatność diagnostyczną. Z drugiej strony istniały także prace dowodzące o indukowanej przez monoklonalne anty-lipidowe przeciwciała remielinizacji, co mogło sugerować ich zastosowanie terapeutyczne. W pracy przybliżono także informacje o lipidach, jako nowatorskich narzędziach immunoregulujących, stosowanych w leczeniu chorób autoimmunizacyjnych, w tym MS.

2. **M. Podbielska**, S. Dasgupta, S.B. Levery, W.W. Tourtellotte, H. Annuk, A.P. Moran, E.L. Hogan. Novel myelin penta- and hexa-acetyl-galactosyl-ceramides: structural characterization and immunoreactivity in cerebrospinal fluid. *J. Lipid Res.* 51(6), 1394-1406, 2010.

W pracy przedstawiono analizę strukturalną najbardziej złożonych penta- i hekso- acetylowanych pochodnych β -GalCer uzyskaną za pomocą spektrometrii masowej i jądrowego rezonansu magnetycznego. FMC-5 i FMC-6 scharakteryzowano jako 3- O-acetylo-sphingozyno-2,3,4,6-tetra-O-

acetylo- β -GalCer z odpowiednio pozbawionym grupy hydroksylowej kwasem tłuszczowym i 2-hydroksykwasem tłuszczowym. Najbardziej hydrofobowy, FMC-7 określono jako 3-*O*-acetylo-sfingozyno-2,3,4,6-tetra-*O*-acetylo- β -GalCer (2-*O*-acetylo-HFA). Acetylowane GSLs zastosowano do oznaczania poziomu reagujących z nimi immunoglobulin w płynach mózgowo-rdzeniowych pacjentów z MS, jak również pacjentów manifestujących inne choroby neurologiczne o podłożu zapalnym lub o innej etiologii. Największą reaktywność do FMC-7 zaobserwowano u pacjentów z zapaleniem opon mózgowych, zapaleniem opon mózgowych i rdzenia kręgowego oraz w podostrym stwardniającym zapaleniu mózgu. W grupie pacjentów z MS wykazano, że poziom przeciwciał anti-FMC-7 był znacznie wyższy w PPMS w porównaniu z SPMS oraz w RRMS, w fazie remisji, w porównaniu z SPMS. Dodatkowo, u niektórych pacjentów z MS zaobserwowano zwiększoną reaktywność z hydrofobowym FMC-7, jak również z lipidem MfGL-II z *M. fermentans*. Dowiedziona krzyżowa reaktywność przeciwciał przeciwko tym dwóm glikolipidowym antygenom może sugerować molekularną mimikrę jako patomechanizm inicjujący MS.

3. **M. Podbielska**, Z.M. Szulc, E. Kurowska, E.L. Hogan, J. Bielawski, A. Bielawska, N.R. Bhat. Cytokine-induced release of ceramide-enriched exosomes as a mediator of cell death signaling in an oligodendroglial cell line. *J. Lipid Res.* 57(11), 2028-2039, 2016.

Wcześniejsze doniesienia literaturowe wskazywały na to, iż Cer odgrywają rolę w procesie apoptozy wielu komórek, w tym oligodendrocytów. Jednakże wewnątrzkomórkowy poziom Cer nie pozwalał na wytłumaczenie cytotoksycznego efektu działania TNF- α i IFN- γ będącego wynikiem synergistycznego działania obu cytokin. Wyjaśnienie roli bioaktywnych mediatorów lipidowych, szczególnie Cer, w patogenezie MS przeprowadzono na modelu *in vitro* na ludzkiej linii komórek gleju skąpowypustkowego (skąpodrzewiaka oligodendroglioma; HOG). Wykazano, że mikropęcherzyki, tj. egzosomy, uwolnione przez traktowane uprzednio za pomocą TNF- α komórki HOG, wywierały na te komórki, podobnie jak poszczególne cytokiny, efekt łagodnie toksyczny. Natomiast stymulacja, indukowanymi przez TNF- α egzosomami, dziewiczych komórek HOG, traktowanych uprzednio IFN- γ , znacznie zmniejszała przeżywalność tych komórek, przypominając cytotoksyczny efekt będący wynikiem synergistycznego działania obu cytokin. Dodatkowo, przeprowadzone metodą spektrometrii masowej HPLC-MS/MS analizy potwierdziły pozakomórkowe uwalnianie egzosomów zawierających główne sfingolipidowe składniki komórek HOG, m.in. C16-, C24- i C24:1-Cer; dhC16-, dhC24- i dhC24:1-Cer oraz C16-, C24- i C24:1-SM. Ponadto stymulacja egzogennym krótkołańcuchowym C6-Cer (metabolizowanym do długołańcuchowych Cer) oraz C16-Cer (proapoptotycznym składnikiem egzosomów), wskazywała na udział tych Cer w cytotoksycznym efekcie, potwierdzając tym samym synergistyczny mechanizm działania obu cytokin.

4. J. O'Keeffe, **M. Podbielska**, E.L. Hogan. Invariant natural killer cells and their ligands: focus on multiple sclerosis. *Immunology* 145, 468-475, 2015.

Niniejsza praca przeglądowa podsumowuje stan wiedzy na temat komórek iNKT, ich lipidowych ligandów ze szczególnym uwzględnieniem roli jaką pełnią w MS. Lista lipidowych i glikolipidowych antygenów będących stymulatorami komórek iNKT obejmuje: i) syntetyczny glikolipid, α -GalCer i jego analogi (np. OCH), ii) endogenne antygeny (np. iGB3, FMC-7) oraz iii) egzogenne ligandy bakteryjne (np. α -GlcACer, α -GalACer, α -GlcDAG, α -GalDAG, PIM2). Postęp w badaniach mających na celu określenie charakteru lipidów rozpoznawanych przez komórki iNKT w chorobach autoimmunologicznych, takich jak MS, może sprzyjać rozwojowi strategii terapeutycznych z zastosowaniem aktywności komórek iNKT.

5. C. Gately, **M. Podbielska**, T. Counihan, M. Hennessy, T. Leahy, A.P. Moran, E. L. Hogan, J. O'Keeffe. Invariant natural killer T-cell anergy of circulating lymphocytes to myelin polyacetylated- β -galactosyl-ceramides in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 259 (1-2), 1-7, 2013.

Przedstawione wyniki stanowią kontynuację naszych badań nad rolą komórek iNKT w MS. Funkcję komórek iNKT badano prowadząc stymulację dwoma pochodzącymi z mieliny GSLs, tj. mieszaniną FMC-5 i FMC-7 oraz oczyszczonym FMC-7. U osób zdrowych stymulacja PBMCs za pomocą FMCs znacznie zwiększyła ilość komórek iNKT, podobnie jak w przypadku stymulacji syntetycznym ligandem, tj. α -GalCer, i skutkowała wydzieleniem cytokin Th1, Th2 i Th17. W przeciwieństwie do osób zdrowych, pacjenci z MS nie odpowiadali na stymulację FMC, ani α -GalCer, wskazując na stan anergii. Postulowano, że pochodzące z mieliny GSLs, tj. FMCs, pobudzają odpowiedź komórek iNKT *in vivo* co jest zablokowane w MS.

6. **M. Podbielska**, A. Das, A. W. Smith, A. Chauhan, S. K. Ray, J. Inoue, M. Azuma, K. Nozaki, E. L. Hogan and N. L. Banik. Neuron-Microglia Interaction Induced Bi-directional Cytotoxicity Associated with Calpain Activation. *J. Neurochem.* 139(3), 440-455, 2016.

Dotychczas nie udało się wyjaśnić mechanizmu postępującej neurodegeneracji w MS. Na podstawie naszych wcześniejszych badań założono, że uszkodzone, np. w czasie rozwoju reakcji zapalnej neurony, uwalniają pozakomórkowo szereg mediatorów, m.in. zależną od Ca^{2+} proteazę, tj. kalpainę, które następnie aktywują mikroglej. Nasunęło to przypuszczenie, że uszkodzenie neuronów i aktywacja mikrogleju, tj. dwukierunkowa interakcja między neuronami i mikroglejem, mogą być zaangażowane w postępującą neurodegenerację w MS. Hipotezę tę sprawdzano na dwóch modelach,

in vitro, badając: i) wpływ czynników wydzielonych z uszkodzonych szczurzych pierwszorzędowych neuronów kory mózgowej na szczurzy pierwszorzędowy mikroglej oraz ii) wpływ czynników uwalnianych z aktywowanych przez przeciwciała anti-CD3/CD28 limfocytów T pochodzących z jednojądrzastych komórek krwi obwodowej pacjentów z MS na ludzkie pierwszorzędowe neurony. Pierwszy model wykazał, że uszkodzone przez prozapalną cytokinę IFN- γ , neurony uwalniają mediatory, w tym kalpainę, aktywując tym samym mikroglej, który z kolei wyzwała czynniki neurotoksyczne (ROS, NO). Ta samopowielająca się aktywacja mikrogleju, tzw. reaktywna mikroglejoza, jest odpowiedzialna za chroniczny stan zapalny i postępującą neurodegenerację. Obecność uwolnionej w tym procesie, z neuronów i mikrogleju, kalpains potwierdzono przez zastosowanie inhibitorów kalpains (kalpeptyny i SNJ-1945), jak i wyciszenia genów kalpains 1 i 2 za pomocą techniki siRNA. W drugim modelu wykorzystano autoreaktywne limfocyty T pochodzące z PBMCs od pacjentów z MS jako źródło prozapalnych cytokin Th1/Th17. Model ten potwierdził obecność kalpains, jako kluczowego sygnału stymulującego postępującą neurodegenerację w MS. Te spostrzeżenia dotyczące wzajemnej parakrynej regulacji uszkodzenia komórek i aktywacji kalpains w progresywnej fazie MS, i innych chorobach neurodegeneracyjnych sugerują potencjalne korzyści prewencyjne i możliwość opracowania strategii terapeutycznych wykorzystujących między innymi hamowanie kalpains.

Uważam, że najważniejsze i najbardziej interesujące wyniki zawarte w przedstawionym przeze mnie do oceny cyklu prac to:

1. **Identyfikacja i charakterystyka strukturalna nowych lipidowych składników mieliny, tj. penta- i hekso-acetylo- β -GalCer, z uwzględnieniem wpływu ich budowy na charakter fizykochemiczny i aktywność biologiczną [publikacja 2].**
2. **Wykazanie, że mielinowe poli-acetylowane pochodne β -GalCer, tj. FMC-7, mogą inicjować odpowiedź autoimmunologiczną na drodze molekularnej mimikry [publikacja 2].** Wiązało się to z zaobserwowaniem krzyżowej reaktywności przeciwciała anti-FMC-7 z MfGL-II z *M. fermentans* i LPS z *E. coli* J5. Ponadto stwierdzono podwyższone miano przeciwciał anti-FMC-7 w CSF u pacjentów z postacią kliniczną RRMS w fazie remisji i PPMS, w obu przypadkach w odniesieniu do postaci SPMS.
3. **Wykazanie roli bioaktywnych mediatorów lipidowych w indukowaniu apoptozy komórek HOG za pomocą prozapalnych cytokin Th1 [publikacja 3].** Określenie komórkowego i egzosomalnego profilu bioaktywnych mediatorów lipidowych w komórkach HOG umożliwiło wykazanie, że egzosomalne SLs, zwłaszcza C16-, C24- i C24:1-Cer, biorą udział w procesie apoptozy indukowanej przez prozapalne cytokiny typu Th1. Ponadto zastosowanie

egzogennych Cer potwierdziło udział tych bioaktywnych mediatorów w mechanizmie synergistycznego działania cytokin TNF- α i IFN- γ . Uzyskane wyniki wskazują możliwość wykorzystania składu biochemicznego egzosomów, jako przyszłościowego markera w diagnostyce klinicznej.

4. **Zaobserwowanie hiporeaktywności komórek iNKT od pacjentów z MS po stymulacji endogennym lipidowym ligandem FMC-7 [publikacja 5].** Manifestowało się to zwiększonym odsetkiem komórek iNKT u pacjentów z MS, w porównaniu do osób zdrowych. Co więcej, komórki iNKT u pacjentów z MS, w przeciwieństwie do komórek osób zdrowych, nie odpowiadały na stymulację endogennym antygenem, FMC-7, ani na stymulację syntetycznym GSL, α -GalCer. Uzyskane wyniki wskazują możliwości potencjalnego wykorzystania zjawiska anergii leukocytów krążących we krwi obwodowej pacjentów z MS w immunoterapii MS z zastosowaniem wyżej wymienionych GSLs.
5. **Wykazanie interakcji odporności nabytej i wrodzonej na przykładzie „dialogu” autoreaktywnych limfocytów T i komórek mikrogleju, jako głównych czynników zaangażowanych w postępującą fazę MS [publikacja 6].** Odzwierciedla to zaproponowany mechanizm stymulujący postępującą neurodegenerację w MS, zależny od aktywnej mikroglejozy, w której zasadniczą rolę odgrywa kalpaina. Wykazano, że uwolniona, wskutek uszkodzenia neuronów, kalpaina aktywuje komórki mikrogleju, które generują neurotoksyczne substancje, takie jak ROS i NO. Uszkodzone neurony z kolei mogą propagować neurotoksyczność poprzez wysyłanie prozapalnych sygnałów do komórek mikrogleju. Ponadto wykazano rolę kaspaz, a zwłaszcza efektorowej kaspazy-3, w tym procesie. Modulacja aktywności kalpainy może minimalizować toksyczne działanie uwalnianych w nadmiarze wolnych rodników podczas długotrwałego procesu zapalnego, co implikuje potencjalnie korzystne strategie profilaktyczne i terapeutyczne.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

Podsumowanie

Mój dorobek naukowy obejmuje współautorstwo w 22 pracach, w tym 17 anglojęzycznych opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports. Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora opublikowano 20 prac, w tym 8 oryginalnych pełnotekstowych (pierwszy autor - 5 prac), 4 prace w suplementach czasopism oraz 8 prac poglądowych (pierwszy autor - 6 prac, autor korespondencyjny - 2 prace). Ponadto jestem współautorem w 21 komunikatach zjazdowych, w tym 18 prezentowanych na wiodących konferencjach międzynarodowych i 3 na konferencjach krajowych. Sumaryczny współczynnik wpływu (*Impact Factor*, IF) za wszystkie prace oryginalne pełnotekstowe i poglądowe wynosi 49,64 (punkty MNI_{SW}=335,0). Do dnia 31 maja 2018 roku,

według bazy Web of Science (WoS, All databases), prace były cytowane 176 razy (wyłączono autocytowania), a indeks Hirsh'a wynosi 8. Łączny IF sześciu prac objętych rozprawą habilitacyjną wynosi 25,151 (punkty MNiSW=184,0; liczba cytowań=68). Ponadto w ramach działalności naukowej uczestniczyłam w 2 projektach badawczych finansowanych przez Komitet Badań Naukowych oraz 11 międzynarodowych projektach badawczych w tym: 4 projektach sponsorowanych by National Institutes of Health (NIH) Bethesda, MA, USA; 1 projekcie finansowanym przez National Multiple Sclerosis Society (NMSS), New York, NY, USA; 2 grantach wewnętrznych dotowanych przez Georgia Regents University (GRU), Augusta, GA, USA; 1 projekcie sponsorowanym przez Multiple Sclerosis International Federation (MSIF), London, Wielka Brytania; 1 projekcie wspieranym finansowo przez Fundację Kościuszkowską; 1 projekcie sponsorowanym przez Polsko-Amerykańską Komisję Fulbrighta oraz 1 projekcie wewnętrznym finansowanym przez Medical University of South Carolina (MUSC). W przypadku 4 z tych projektów pełniłam funkcję kierownika projektu badawczego. W chwili obecnej realizuję grant międzynarodowy HARMONIA 4 sponsorowany przez Narodowe Centrum Nauki, w którym pełnię funkcję kierownika.

a) Przebieg pracy naukowej przed uzyskaniem stopnia doktora

Pracę badawczą oraz pracę dyplomową realizowałam pod kierunkiem Profesora dr. hab. Huberta Krotkiewskiego w Laboratorium Immunochemii Tkankowej w IITD PAN we Wrocławiu. Temat mojej pracy magisterskiej doskonale wpisywał się w nurt wieloletnich badań nad glikoforyną A (GPA) oraz innymi składnikami membrany erytrocytów związanych z antygenami grupowymi krwi, jak również badań nad innymi antygenami, prowadzonych w tym laboratorium pod kierunkiem Profesor dr hab. Elwiry Lisowskiej. Można tu wymienić np. antygeny M i N, Lewis, Duffy, glikolipidy odpowiedzialne za rzadko występującą poliaaglutynację typu 'NOR' erytrocytów ludzkich, czy też antygen karcynoembrionalny (CEA). Realizowana przeze mnie praca magisterska dotyczyła identyfikacji antygenów grupowych A i B w łańcuchach O-glikozydowych GPA. Antygeny grupowe układu ABO reprezentują nieredukujące zakończenia łańcuchów cukrowych GSLs i glikoprotein, jak również mogą występować w formie wolnych oligosacharydów. Powszechna obecność antygenów grupowych ABH w różnych tkankach i alloprzeciwciał anty-A i anty-B w surowicy implikuje problemy przy transplantacji, w przypadku niezgodności grupowej pomiędzy dawcą i biorcą.

W ludzkiej błonie erytrocytarnej występowanie antygenów ABH jest właściwe dla GSLs i glikoprotein. GPA należy do najlepiej poznanych białek błonowych. Jest to białko transmembranowe typu I, tzn. jednokrotnie przebija membranę komórki, jego aminokwas N-końcowy znajduje się na zewnątrz komórki, zaś aminokwas C-końcowy w cytoplazmie. Cząsteczka białka, składająca się ze 131

aminokwasów, prezentuje typową dla białek błonowych budowę trójdomenową. Domena zewnątrzkomórkowa obejmuje glikozylowany fragment łańcucha polipeptydowego. W GPA występują dwa typy łańcuchów oligosacharydowych: dwanaście łańcuchów O-glikozydowych i jeden łańcuch N-glikozydowy na cząsteczkę białka.

Łańcuchy O-glikozydowe wykazują charakterystyczną sekwencję rdzeniową: Gal β 1 $\rightarrow$ 3GalNAc. Najczęstsza postać O-glikanów to ten dwusacharyd podstawiony dwiema resztami kwasu sjałowego, oraz trójsacharydy zawierające jedną resztę kwasu sjałowego. Łańcuch N-glikozydowy to oligosacharyd dwuantenowy zawierający: fukozę (Fuc) przy reszcie N-acetyloglukozaminy (GlcNAc) wiążącej się z peptydem, rozdzielającą (*bisecting*) resztę GlcNAc przy β -mannozie (Man) i kwas sjałowy przyłączony do jednej bądź do obu reszt galaktozy (Gal).

Badania prowadzone przez zespół Kobaty, jak również w naszym Laboratorium, wskazywały, że zarówno w oligosacharydach O-glikozydowych, jak i N-glikozydowych, wydzielonych z GPA-O, są obecne antygeny grupowe H. Wydawało się więc wysoce prawdopodobnym, że w łańcuchach cukrowych GPA, w zależności od grupy krwi, można oczekiwać obecności odpowiednich antygenów grupowych. GPA, główna sjałoglikoproteina membran erytrocytów ludzkich, stanowiła potencjalny nośnik antygenów grupowych. Założenie to stworzyło szansę na otrzymanie obiecujących wyników w wyniku realizacji tematu mojej pracy magisterskiej. Z oczyszczonych frakcji GPA za pomocą β -eliminacji wydzielono zarówno łańcuchy O-glikozydowe (A-O-glik, B-O-glik), jak i N-glikozydowe (A-N-glik, B-N-glik).

Wyniki analiz immunochemicznych (Western blot, test hamowania aglutynacji) wykazały obecność antygenów grupowych A i B w preparatach A-O-glik i A-N-glik oraz B-O-glik i B-N-glik wydzielonych odpowiednio z GPA-A i GPA-B. Wstępna analiza strukturalna za pomocą spektrometrii masowej ESI-MS wykazała obecność jonu m/z 1389 dokładnie odpowiadającego masie rozgałęzionego heptasacharydu, zawierającego antygen grupowy A. Jednakże nie udało się przeprowadzić analizy struktury tego jonu metodą tandemowej spektrometrii masowej, która mogłaby dostarczyć dowodu na istnienie jonów sekwencyjnych potwierdzających obecność antygeny grupowego A. Przeprowadzenie kolejnych analiz było więc zasadne.

Po ukończeniu studiów, w 1997 roku rozpoczęłam pracę w IITD PAN we Wrocławiu na stanowisku asystenta w Laboratorium Immunochemii Tkankowej. Podjęte w ramach pracy magisterskiej badania, dotyczące analizy strukturalnej łańcuchów O-glik i N-glik wydzielonych z GPA stały się przedmiotem mojej pracy doktorskiej zatytułowanej „Antygeny grupowe A, B i H w glikoforynie A erytrocytów ludzkich”. Kluczowym elementem realizowanych w tym okresie prac badawczych była wieloletnia współpraca z Profesorem Bo Nilssonem (Swedish Defence Research Agency, Division of NBC, Umeå) i możliwość korzystania z niedostępnego wówczas w IITD spektrometru masowego.

Celem badań pracy doktorskiej była:

- immunochemiczna identyfikacja epitopów ABH, zarówno w łańcuchach O-glikozydowych, jak i N-glikozydowych GPA pochodzącej z erytrocytów grupy A, B i O;
- analiza strukturalna O-glikanów i N-glikanów w aspekcie oznaczenia struktur zawierających epitopy ABH.

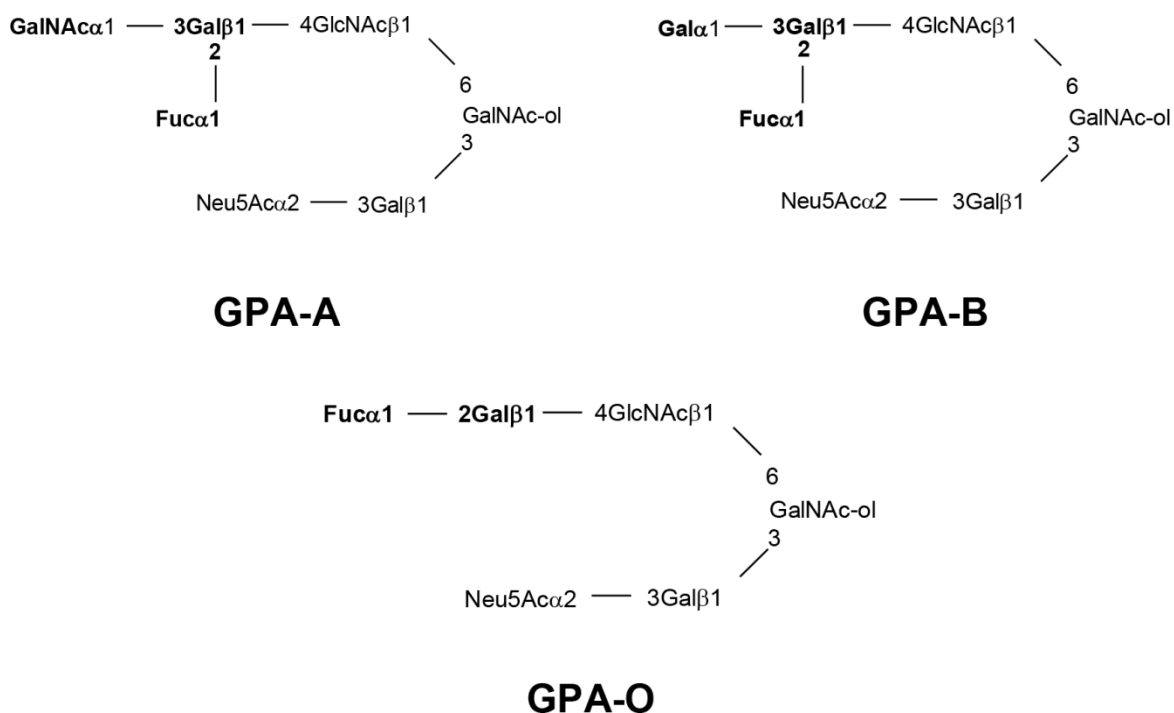
Aby ustalić kompletne struktury O-glik i N-glik wydzielonych odpowiednio z GPA-A, GPA-B i GPA-O przeprowadziłam serię wzajemnie dopełniających się analiz strukturalnych metodą nanoESI-MS/MS.

Do najważniejszych wyników uzyskanych w trakcie wykonywania mojej pracy doktorskiej należą:

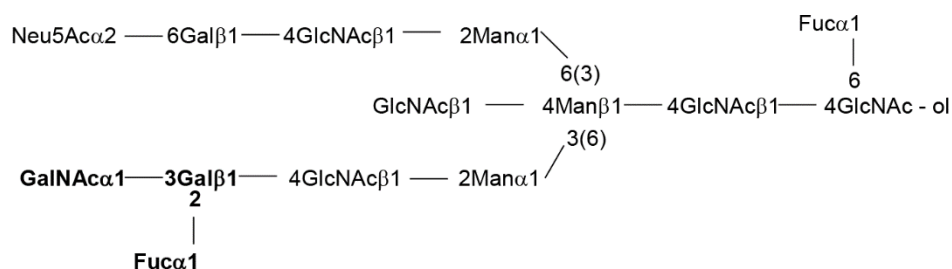
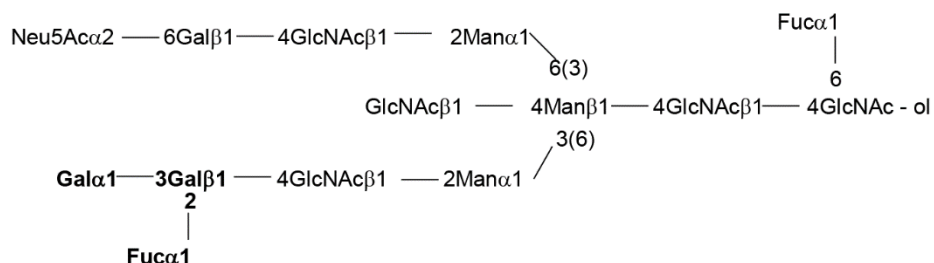
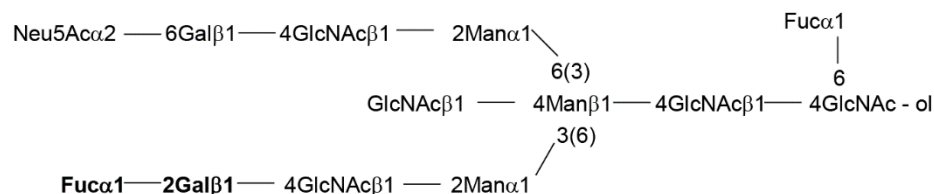
- Dowiedzenie, że GPA, w zależności od statusu grupowego A, B, O erytrocytów, jest nośnikiem odpowiednio antygenów grupowych A, B lub H.
- Potwierdzenie, że antygeny te są obecne jako składnik strukturalny zarówno O-glik (Załącznik 3, IIA[11]), jak i N-glik (Załącznik 3, IIA[6]).
- Wykazanie za pomocą metod immunochemicznych (Western blot, test hamowania aglutynacji, test ELISA), że antygenów tych jest ilościowo więcej w łańcuchach N-glik, w porównaniu z preparatami O-glik. Interesujący okazał się wynik świadczący o wyższej ekspresji antygeny A w O-glikanach wydzielonych z GPA-A, w porównaniu do ekspresji antygeny B w O-glikanach wydzielonych z GPA-B.
- Stwierdzenie w analizowanych preparatach obecności typowych, dla tego rodzaju oligosacharydów, składników cukrowych oraz sposobu ich podstawienia, tj. kwasu sialowego na węglu C-3 Gal i węglu C-6 GalNAc.
- Nieodnotowanie zależności pomiędzy pochodzeniem preparatu (z grupy krwi A, B czy O), a składem glikanów tzn. nie zaobserwowano przewagi GalNAc, która jest immunodominantą antygeny A w preparatach pochodzących z GPA-A, oraz przewagi Gal w preparatach pochodzących z GPA- B. W analizie metylacyjnej nie wykazano również obecności metylowych pochodnych, które powinny powstać ze składników epitopów ABH.
- Wykazanie metodą powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR) obecności determinant antygenowych ABH, przy czym nie zauważono różnic w ilości antygeny A lub B w niezależnie uzyskanych preparatach odpowiednio GPA-A lub GPA-B.
- Wykazanie metodą Western blot swoistego wiązania przeciwciał anty-A, anty-B bądź lektyny *Ulex europaeus*, swoście rozpoznającej antygen H, do prążków odpowiednio GPA-A, GPA-B, GPA-O potwierdzających obecność łańcuchów cukrowych z epitopami ABH w GPA.
- Potwierdzenie, przy zastosowaniu tandemowej spektrometrii masowej nanoESI-MS/MS, wyników uzyskanych metodami immunochemicznymi i wykazanie obecności

oligosacharydów zawierających w swojej strukturze epitopy ABH. Anomerię wiązań w *O*- i *N*-glikanach podano na podstawie danych literaturowych dotyczących łańcuchów oligosacharydowych GPA i antygenów ABH. Ostatecznie zaproponowano struktury sześciu nowych struktur łańcuchów cukrowych GPA zawierających epitopy ABH.

- Określenie rozgałęzionej struktury rdzeniowej O-glikanów (typu 2) wydzielonych z GPA (Zał. 3, IIA[11]).



- Oszacowanie, że ilość *O*-glikanów, zawierających antygeny grupowe ABH, mieści się w granicach ok. 1% całej puli łańcuchów O-glikozydowych, wydzielonych odpowiednio z GPA-A, GPA-B i GPA-O.
- Ustalenie struktury wydzielonych z GPA *N*-glikanów jako łańcuchów typu złożonego, z resztą Fuc przy GlcNAc wiążącej się z peptydem, z rozdzielającą GlcNAc i zawierającą na jednym końcu nieredukujący kwas sialowy, a na drugim odpowiedni antygen grupowy w zależności od pochodzenia preparatu (Zał. 3, IIA[6]).
- Oszacowanie, że ilość *N*-glikanów, zawierających antygeny grupowe H, mieści się w granicach ok. 2-6% całej puli łańcuchów N-glikozydowych, wydzielonych z GPA-O, podczas gdy ilość *N*-glikanów, zawierająca antygeny grupowe A i B, mieści się w granicach ok. 1-2% całej puli łańcuchów N-glikozydowych, wydzielonych odpowiednio z GPA-A lub z GPA-B.

GPA-A**GPA-B****GPA-O**

- Wykazanie mikroheterogenności strukturalnej łańcuchów oligosachrydowych zawierających małe ilości glikanów obejmujących antygeny grupowe ABH, potwierdzające tym samym powszechną obecność antygenów ABH.

Pomimo, że nadal nie udało się określić biologicznej funkcji GPA, jednak znaczący postęp w badaniach immunochemicznych nad tą glikoproteiną dostarczył wielu interesujących danych. Uzyskane w trakcie realizacji mojej pracy doktorskiej wyniki są istotne nie tylko z punktu widzenia podstawowych badań biochemicznych, immunologicznych i genetycznych, ale stanowią wkład do uzupełnienia wiedzy w zakresie badań klinicznych i różnych dziedzin medycyny.

Badania te były realizowane przeze mnie w ramach grantu dla młodego naukowca pt.: „Identyfikacja antygenów grupowych A i B w komponentcie cukrowej glikoforyny A”, w którym pełniłam funkcję kierownika projektu oraz grantu promotorskiego zatytułowanego „Badania strukturalne antygenów grupowych ABH zawartych w glikoforynie ludzkiej”, w którym byłam głównym wykonawcą. Granty te były sponsorowane przez Komitet Badań Naukowych. Pracę doktorską wykonaną pod kierunkiem Prof. dr. hab. Huberta Krotkiewskiego, obroniłam w 2003 r. z wyróżnieniem nadanym przez Radę Naukową IITD PAN. Uzyskane wyniki prezentowane były na kilku konferencjach międzynarodowych (Zał. 3, IIIB[15,16,18-20]) i krajowych (Zał. 3, IIIB[14,17,21]) oraz stanowią przedmiot trzech prac oryginalnych (Zał. 3, IIA[6,11] i IID[5]) i jednej pracy przeglądowej (Zał. 3, IID[4]).

b) Przebieg pracy naukowej po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora, w latach 2003-2004 moje zainteresowania naukowe koncentrowały się na monitorowaniu zmian galaktozylacji w komponentcie cukrowej surowiczej IgG pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów (ang. *rheumatoid arthritis*, RA).

Badania obejmowały:

- opracowanie testu ELISA z zastosowaniem lektyn do rutynowego oznaczania galaktozylacji IgG w licznych próbkach;
- porównanie wyników testu ELISA z wynikami uzyskanymi metodami instrumentalnymi (GLC-MS, SPR) i ustalenie stopnia wiarygodności zmodyfikowanego testu ELISA;
- ustalenie czy leczenie według różnych schematów terapeutycznych wpływa na obniżenie galaktozylacji IgG i tym samym czy następuje rekonstrukcja konserwatywnych *N*-glikanów w komponentcie cukrowej IgG u pacjentów z RA w trakcie leczenia oraz czy zależy to od zastosowanej terapii.

Temat badawczy realizowałam wspólnie ze współpracownikami z IITD PAN oraz Oddziału Reumatologii Uniwersytetu Medycznego (UM) we Wrocławiu, pod kierunkiem Profesora dr. hab. Jacka Szechińskiego. Temat ten jest również przedmiotem rozprawy doktorskiej Dr Marty Pasek pt.: "Badanie glikozylacji surowiczej immunoglobuliny G pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów."

Na podstawie wstępnych badań przeprowadzonych na wzorcowych próbkach nietraktowanej i enzymatycznie modyfikowanej IgG (asialo-agalakto-IgG) dokonano optymalizacji testu ELISA. Do oznaczania galaktozylacji IgG wprowadzono następujące modyfikacje: i) opłaszczanie płytki wydzielonymi na kolumnie powinowactwa preparatami IgG; ii) przeprowadzenie redukcji IgG bezpośrednio na płytce. Powodzenie tej próby umożliwiło śledzenie ewentualnych zmian glikozylacji w strukturach *N*-glikanów, do których może dochodzić w trakcie przebiegu schorzenia. Otworzyło to drogę pierwszym próbom porównywania oraz oceny struktur łańcuchów *N*-glikozydowych *in situ*, bez konieczności przeprowadzania czasochłonnych preparacji. Jako wskaźnik agalaktozylacji IgG (ang. *agalactosylation factor*, AF) przyjęto stosunek wartości uzyskanego względnego (wobec próbki kontrolnej) wiązania lektyny *Griffonia simplicifolia* (GSL-II), rozpoznającej terminalną, nieredukującą GalNAc, do względnego wiązania *Ricinus communis* (RCA-I) tj. lektyny rozpoznającej terminalną, nieredukującą Gal. Wyniki badań zostały zaprezentowane na zjazdach naukowych (Zał. 3, IIIB[12-13]) i opublikowane (Zał. 3, IIA[9]). Warto nadmienić, że praca została wyróżniona nagrodą Rektora UM za publikację, powstałą we współpracy pomiędzy Uniwersytetem Medycznym i IITD PAN, opublikowaną w 2006 roku w czasopiśmie o najwyższym współczynniku wpływu.

Zagraniczne staże podoktorskie

W 2004 roku rozpoczęłam staże podoktorskie w Augusta University (uprzednio Georgia Regents University i Medical College of Georgia) w Augusta, GA, USA. Pierwszy staż odbyłam w Laboratorium Prof. dr. Piotra Kraja w Center of Biotechnology and Genomic Medicine. W tym czasie byłam zaangażowana w realizację projektu zatytułowanego: "Analiza funkcjonalna populacji limfocytów T CD4⁺ w kontekście przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej", realizowanego w ramach grantu (R01 CA107349-01A1) sponsorowanego przez National Institutes of Health (NIH) w Bethesda, MA, USA.

Celami tego projektu było:

- określenie lokalizacji przestrzennej i czasowej specyficznych dla nowotworu klonów komórek T CD4⁺ w czasie rozwoju przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej gospodarza;
- zdefiniowanie roli komórek CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg w modulowaniu przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej.

Badania prowadzono na myszach transgenicznym z ograniczonym, ale wciąż poliklonalnym repertuarem receptora $\alpha\beta$ TCR („TCR^{mini} mouse”). Prototyp receptora TCR zastosowany do zaprojektowania konstruktu DNA użytego do produkcji tych myszy rozpoznawał peptyd Ep63K prezentowany przez cząsteczki MHC klasy II, A^b. W modelowej myszy transgenicznej łańcuch TCR β , ekspresjonowany przez wszystkie komórki T był identyczny, jak łańcuch TCR β prototypowego TCR. Natomiast łańcuch TCR α , został skonstruowany poprzez wbudowanie genomowego segmentu kodującego V α 2 i J α 26 do wektora pT α ¹⁰⁹. Umożliwiło to naturalną rearanżację genu V α 2 do jednego z dwóch genów J α : J α 26 lub J α 2. Przy takim rozwiązaniu, jeden łańcuch β mógł tworzyć pary z różnymi łańcuchami α . Zatem różnorodność repertuaru receptorów $\alpha\beta$ TCR powstałych w wyniku rearanżacji tych genów w transgenicznej myszy była ograniczona do hiperzmiennego regionu CDR3 łańcucha α . Analizę funkcjonalną limfocytów T CD4⁺ prowadzono na dwóch modelach nowotworowych: czerniaka i raka gruczołu krokowego. Indukcji czerniaka dokonano poprzez podskórne podanie komórek B16-F1 uprzednio transfekowanych kompleksem A^bEp63K myszom TCR^{mini}. Natomiast raka gruczołu krokowego indukowano przez podskórną iniekcję komórek RM-1 i TRAMP-C1, wykazujących ekspresję peptydu Ep63K w zmodyfikowanej nukleoproteinie wirusa grypy, modelowym myszom transgenicznym. Projekt zakładał wykorzystanie panelu specyficznych dla peptydu EP63K hybrydom, jako narzędzi do badania powinowactwa receptora TCR do kompleksu peptyd-MHC klasy II. Osobiście byłam zaangażowana w testowanie i optymalizację metody 2D-SSCP (ang. *two dimensional single-stranded conformation polymorphism*) stosowanej do analizy klonów T CD4⁺. Za bardzo cenne doświadczenie z tego okresu uważam interakcję z Prof. Leszkiem

Ignatowiczem i Dr. Rafałem Pacholczykiem. Pobyt ten, aczkolwiek krótki, dał podwaliny do mojego rozwoju naukowego, co niewątpliwie zaowocowało w niedalekiej przyszłości.

Moje zainteresowania naukowe ewoluowały w czasie stażu odbytego w latach 2005-2010 w Laboratorium Prof. Edwarda L. Hogana, w Institute of Molecular Medicine and Genetics w tym samym ośrodku naukowym. Byłam wówczas zaangażowana w kilka równolegle prowadzonych projektów tematycznie związanych z poznawaniem mechanizmów powstawania i przebiegu MS. Jeden z nich dotyczył badań strukturalnych i funkcjonalnych odkrytych, przez zespół Hogana, nowych lipidowych składników mieliny (FMCs). Część strukturalna tego projektu obejmowała izolację, oczyszczanie i ustalenie struktur najbardziej złożonych przedstawicieli rodziny acetylowanych pochodnych β -GalCer oraz produkcję i oczyszczanie króliczych przeciwciał poliklonalnych przeciwko tym lipidowym antygenom. Badania te realizowano w ramach grantu pt.: „Infekcja a stwardnienie rozsiane” (R21 NIH NS 51666-01A1) finansowanego przez NIH oraz grantu zatytułowanego: „Czynniki patogenne wywołujące stwardnienie rozsiane” (RG 3473) sponsorowanego przez National Multiple Sclerosis Society (NMSS) w New York, NY, USA. W trakcie realizacji tych projektów cenną przyjaźnią i wsparciem zawodowym otoczył mnie Prof. Robert K. Yu, dyrektor tego ośrodka. Praca w bliskim sąsiedztwie z jego Laboratorium dała mi unikalną możliwość interakcji z naukowcami z Japonii (Prof. Kenichi Kaida, Dr Toshio Ariga, Dr Makoto Yanagisawa, Dr Yoshihiko Nakatani), wybitnymi ekspertami w dziedzinie lipidologii. Regularnie i aktywnie uczestniczyłam w spotkaniach z tą grupą. Skutkowało to, nie tylko rozwojem moich umiejętności technicznych, ale również postępem w prowadzonych przeze mnie badaniach naukowych. Zrozumiałam wówczas, jak ważna jest systematyczna współpraca pomiędzy badaczami pracującymi nad różnymi zadaniami i na różnych modelach badawczych, prowadząca do wzajemnego wzrostu potencjału badawczego.

Badania funkcjonalne dotyczyły poszukiwań podobieństw strukturalnych i immunologicznych, leżących u podstaw mimikry molekularnej, pomiędzy FMCs a glikolipidami pochodzenia bakteryjnego. Niezależnie prowadzono również badania funkcjonalne *in vitro* związane z oceną odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego po stymulacji FMCs. Projekt ten realizowano we współpracy z Prof. Anthony'm P. Moranem oraz Dr Joan O'Keeffe z Galway-Mayo Institute of Technology, Galway, Irlandia. Wyniki badań zaprezentowano w postaci plakatów na konferencjach naukowych (Zał. 3, IIIB[5-11]), a następnie opublikowano – **publikacja 1, 2, 4 i 5** – w cyklu prac stanowiących szczególne osiągnięcie naukowe oraz publikacje (Zał. 3, IIIA[3,4,6,7,9] i IIID[2-3]).

Kolejny projekt dotyczył identyfikacji antygenów lipidowych wiążących się do oligoklonalnych immunoglobulin występujących w CSF u pacjentów z MS. Jego dalekosiężnym celem było wyjaśnienie roli lipidów w patogenezie MS oraz ekstrapolacja uzyskanej wiedzy w kierunku podjęcia prób terapeutycznych. Badania przesiewowe prowadzono przy użyciu przeciwciał monoklonalnych zrekonstruowanych metodami inżynierii genetycznej z pojedynczych komórek plazmatycznych

CD138⁺ pochodzących z CSF od pacjentów z MS. Były one prowadzone we współpracy z Prof. Norbertem Goebelsem z Heinrich Heine University, Düsseldorf, Niemcy. W późniejszym okresie zostały rozszerzone o analizę funkcjonalną tych przeciwciał zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Do badań tych dołączył również Prof. Marin Krönke z University of Cologne, Cologne, Niemcy. Uzyskane wyniki, na prośbę partnerów zagranicznych z Niemiec, pozostają objęte klauzulą poufności ze względu na propozycję ich wykorzystania jako strategii w programie odkrywania nowych leków przez firmę farmaceutyczną.

Ponadto byłam zaangażowana w realizację szeregu mniejszych projektów finansowanych przez granty wewnętrzne z Augusta University, których celem było wyjaśnienie roli bioaktywnych mediatorów w inicjacji MS.

Wieloletnia praca i trwająca do dzisiaj współpraca z moim Mentorem – Prof. Edwardem L. Hoganem – bez wątpienia odegrała bardzo istotną rolę w moim rozwoju naukowym i pozwoliła w znacznym stopniu rozwinąć warsztat badawczy, za co jestem niezmiernie wdzięczna.

W 2009 roku miałam przyjemność odwiedzić Laboratorium Prof. Noberta Goebelsa, gdzie odbyłam szkolenie w zakresie immunologii molekularnej. W trakcie półrocznego pobytu zapoznałam się z metodologią i technikami biologii molekularnej stosowanymi do produkcji przeciwciał monoklonalnych ‘odtworzonych’ z pojedynczych plazmacytów pochodzących z CSF pacjentów z MS¹¹⁰.

Podypłomowe stypendia zagraniczne

W 2012 roku, jako jedna z jedenastu osób na świecie, otrzymałam nominację do nagrody im. Jacqueline Du Pré, związanej z uzyskaniem sześciomiesięcznego stypendium w wybranym przez laureata ośrodku naukowym. Konkurs organizowany był przez stronę brytyjską – Multiple Sclerosis International Federation, Londyn. Do udziału w konkursie zachęcił mnie Prof. Edward L. Hogan, który po moim wyjeździe z USA nadal aktywnie wspierał moje dążenia do dociekania mechanizmów występujących w MS. Półroczne stypendium odbyłam w Department of Neurosciences w Medical University of South Carolina w Charleston, SC, USA pod bezpośrednią opieką Prof. dr. Narayana R. Bhata. Prof. Bhat prowadził grupę badawczą zajmującą się szlakami sygnałowymi związanymi z demielinizacją na modelu szczurzych i mysich pierwszorzędowych oligodendrocytów. Mój projekt stanowił kontynuację badań rozpoczętych w Augusta University i dotyczył wyjaśnienia roli bioaktywnych mediatorów (m. in. Cer) w indukowaniu zapalnej demielinizacji i próby zahamowania tego patologicznego procesu za pomocą inhibitorów hamujących produkcję Cer. Przebiegał on dwustopniowo. Część pierwszą dotyczącą indukowania śmierci komórek za pomocą TNF- α i IFN- γ na modelu linii komórkowej HOG, jak i pierwszorzędowych hodowli szczurzych oligodendrocytów

przeprowadzono w Laboratorium Prof. Bhata. Część drugą, związaną z analizą SLs metodą HPLC-MS/MS, zrealizowano w Lipidomics Shared Resource (LSR) pod kierunkiem Prof. dr Alicji Bielawskiej – dyrektora tej jednostki. Dwa ostatnie miesiące stypendium spędziłam w LSR. W trakcie tego pobytu nawiązałam aktywną współpracę z Prof. dr Alicją Bielawską, Prof. dr Jackiem Bielawskim, Prof. dr Zdzisławem M. Szulcem oraz innymi pracownikami tej jednostki (Panią Barbarą Rembiesą-Carter i Panem Jasonem Piece). Projekt ten był również finansowany przez grant wewnętrzny z Medical University of South Carolina, w którym byłam współkierownikiem.

Uzyskane podczas stypendium wyniki były przedmiotem doniesień zjazdowych (Zał. 3, IIIB[2-3]), oraz zaowocowały powstaniem **publikacji 3** stanowiącej szczególne osiągnięcie naukowe i publikacji (Zał. 3, IIA[3]).

Kilka miesięcy po powrocie do pracy w Laboratorium Białek Sygnałowych w IITD PAN we Wrocławiu otrzymałam ponowne zaproszenie do MUSC od Prof. Narena L. Banika, którego miałam przyjemność osobiście poznać w trakcie pierwszej wizyty. Zaproszenie to było związane z wygraną ogólnopolskiego stypendialnego konkursu organizowanego przez Fundację Kościuszkowską. Konkurs wymagał m.in. przygotowania własnego projektu badawczego i przejścia przez *Interview* w języku angielskim przeprowadzonego w siedzibie Fundacji Kościuszkowskiej przez pracowników Fundacji zarówno z Polski, jak i z USA.

Kontynuacja pracy w Medical University of South Carolina w latach 2014-2016 dała mi możliwość dalszego rozwoju intelektualnego, pozwoliła poszerzyć horyzonty naukowe, jak również przyczyniła się do dalszego dynamicznego rozwoju warsztatu badawczego. Zainteresowania naukowe Prof. dr. Narena L. Banika przez ponad 20 lat oscylowały wokół roli kalpain w uszkodzeniu rdzenia kręgowego, rozwoju chorób demielinizacyjnych i neurodegeneracyjnych oraz neuroprotektoryjnego działania inhibitorów tych proteaz jako potencjalnej strategii terapeutycznej. W trakcie stypendium byłam zaangażowana w kilka projektów związanych z tematyką badań prowadzonych od lat w tym Laboratorium. Pierwszy z nich dotyczył wyjaśnienia roli kalpainy w zaburzeniu równowagi limfocytów Th1 i Th2 w MS. Badania prowadzono zarówno na liniach komórkowych, jak i pierwszorzędowych komórkach neuronów oraz komórkach mikrogleju. Projekt obejmował próbę modulacji aktywności kalpainy przy użyciu inhibitorów: kalpeptyny i SNJ-1945. Ten ostatni – nowy, nietoksyczny, rozpuszczalny w wodzie związek – otrzymano w ramach współpracy z japońską firmą Senju. Doświadczenia planowano i wykonywano pod kierunkiem Dr. Arabindy Dasa, wieloletniego współpracownika Prof. dr. Narena L. Banika. Wyniki *in vitro* wskazywały, że SNJ-1945 niweluje proces zapalny w fazie inicjacji choroby. Badania poszerzone o fazę progresywną schorzenia realizowano w ramach prestiżowego stypendium Fullbrighta przyznanego przez Polsko-Amerykańską Komisję Fullbrighta oraz w ramach projektu pt.: „Wpływ inhibitora kalpainy na autoreaktywne limfocyty T

i neuroprotekcję w stwardnieniu rozsianym” realizowanego w ramach grantu (5I01BX002349-02) dotowanego przez NIH. Kluczowe wyniki badań nad nowo zidentyfikowanym mechanizmem ukazały się w **publikacji 6** stanowiącej szczególne osiągnięcie.

Obiecujące wyniki badań *in vitro* stanowiły podstawę do ich konytynuacji na modelu zwierzęcym *in vivo*. Do badań tych oprócz testowanego inhibitora SNJ-1945 włączono peptyd aza-MBP. Badania prowadzono w ramach grantu (R01 NS056176-05) sponsorowanego przez NIH pt. „Hamowanie uszkodzenia aksonalnego i śmierci neuronów na modelu EAE”.

Celem projektu było:

- wyjaśnienie mechanizmu, dzięki któremu SNJ-1945 niweluje zarówno proces zapalny, jak i neurodegeneracyjny, prowadząc tym samym do zmniejszenia objawów klinicznych choroby;
- porównanie efektu zmniejszenia nasilenia objawów klinicznych schorzenia u myszy z EAE w zależności od zastosowanego schematu leczenia: monoterapii inhibitorem kalpajny SNJ-1945, monoterapii peptydem aza-MBP jak również terapii skojarzonej aza-MBP/SNJ-1945;
- wyjaśnienie, czy politerapia aza-MBP/SNJ-1945 wpływa na funkcję zapalnych komórek efektorowych.

Interesującym podejściem do tematu było przeprowadzenie próby antygenowo swoistej terapii mającej na celu zablokowanie działania autoreaktywnych limfocytów T poprzez dootrzewnowe podanie zmodyfikowanego autoantygeny tj. zmienionego liganda peptydowego (ang. *altered peptide ligand*, APL). Prototypem tego liganda był naturalnie występujący w osłonce mielinowej peptyd MBP. Projekt zakładał zmianę pojedynczych aminokwasów w antygenie prezentowanym limfocytowi T. Antygen ten miał być dalej wiązany i prezentowany przez cząsteczki MHC klasy II, ale rozpoznający go – poprzez swoisty TCR receptor – limfocyt T nie powinien już na niego odpowiadać. Zaprojektowany przez nas aza-MBP był APL zawierającym aza podstawienie CH(R)-N→N(R)N, typowe dla aza-aminokwasów. W zamyśle peptyd ten miał: i) być odporny na trawienie amino- i karoksy-peptydazami, ii) nie powodować reakcji uczuleniowych oraz co najważniejsze iii) łagodzić objawy kliniczne choroby.

Badania te stały się przedmiotem rozprawy doktorskiej Dr Nicole Trager pt.: „Terapia skojarzona niwelująca proces zapalny i neurodegeneracyjny na modelu stwardnienia rozsianego u gryzoni”. Część wyników została już zaprezentowana na międzynarodowej konferencji naukowej (Załącz. 3, IIB[4]) oraz opublikowana (Załącz. 3, IIA[2]), a część jest w trakcie przygotowywania do druku.

Doświadczenie zawodowe na stanowisku adiunkta w IITD PAN

Od roku 2011 do chwili obecnej kontynuuję pracę naukową na stanowisku adiunkta. Początkowo w Laboratorium Glikokoniugatów pod kierunkiem Prof. dr. hab. Huberta Krotkiewskiego, a od 2012 roku w Laboratorium Białek Sygnałowych pod kierunkiem Prof. dr. hab. Janusza Matuszyka, a następnie Prof. dr. hab. Jakuba Siednienko. W tym czasie rozpoczęłam realizację własnych projektów badawczych. W 2013 roku otrzymałam międzynarodowy grant Harmonia 4 finansowany przez Narodowe Centrum Nauki pt.: „Antygeny lipidowe jako cel ataku autoimmunologicznego w stwardnieniu rozsianym”. W realizację tego innowacyjnego projektu badawczego z pogranicza neurologii, neurobiologii i neuroimmunologii zaangażowani są wykonawcy z trzech ośrodków naukowo-badawczych. W celu poznania mechanizmów odpowiedzi immunologicznej na antygeny lipidowe w patogenezie MS wyznaczono dwa główne zadania badawcze:

- analizę przeciwciał klasy IgG, pochodzących z surowicy oraz CSF od pacjentów z MS, pod kątem ich antylipidowej reaktywności w zależności od manifestacji klinicznej schorzenia;
- określenie poziomu bioaktywnych sfingolipidowych mediatorów w ogniskach zapalno-demielinizacyjnych.

Realizacja projektu przebiega dwukierunkowo. Analiza przeciwciał jest realizowana w IITD PAN we współpracy z Prof. dr. hab. Ryszardem Podemskim, Prof. dr. hab. Małgorzatą Bilińską, Dr hab. Anną Pokryszko-Dragan, klinicystami Kliniki Neurologii Uniwersyteckiego Szpitala Medycznego we Wrocławiu. Analiza tkanek jest prowadzona w placówce partnerów zagranicznych z MUSC w Charleston, SC, USA, a w jej realizację są zaangażowani pracownicy z renomowanego ośrodka badań nad lipidami, tj. LSR: Prof. Alicja i Jacek Bielawscy, Prof. Zdzisław M. Szulc oraz Prof. Edward L. Hogan. W późniejszym okresie do badań dołączyli także Prof. Robert K. Yu i Dr Toshio Ariga z Augusta University. Wspólna praca tych zespołów jest kluczowa dla określenia roli lipidów i wywoływanej przez nie odpowiedzi immunologicznej w patogenezie MS. Pozyskana wiedza może się okazać pomocna w opracowaniu nowych strategii terapeutycznych.

Część wyników została już zaprezentowana na konferencji naukowej (Zał. 3, IIIB[1]) oraz opublikowana w jednej z publikacji [**publikacja 3**] stanowiącej przedmiot niniejszej rozprawy habilitacyjnej oraz omówiona w monografii (Zał. 3, IID[1]) i pracy przeglądowej (Zał. 3, IIA[1]).

Ponadto w dalszym ciągu prowadzę aktywną współpracę naukową z dr Joan O’Keeffe z Galway-Mayo Institute of Technology, Galway, Irlandia. Współpraca ta polega na kontynuowaniu wspólnych badań funkcjonalnych zmierzających do wyjaśnienia roli nowo zidentyfikowanych

lipidowych składników mieliny (FMCs) w mechanizmach odpowiedzi immunologicznej zarówno typu komórkowego, jak i humoralnego.

Aktualnie sprawuję także opiekę naukową nad pracami magisterskimi dwóch studentek z Politechniki Wrocławskiej.

31.05.2018

Data

Podbielska

Podpis

Praca została częściowo sfinansowana przez Międzynarodową Federację Stwardnienia Rozsianego w Londynie (grant Du Pré), Fundację Kościuszkowską, Polsko-Amerykańską Komisję Fulbrighta (Fulbright Senior Award) oraz międzynarodowy grant Harmonia 4 (UMO-2013/08/M/NZ3/01040) finansowany przez Narodowe Centrum Nauki.



Piśmiennictwo

1. Lassmann H. New concepts on progressive multiple sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2007; 7: 239-44.
2. Prins M, Schul E, Geurts J, van der Valk P, Drukarch B and van Dam AM. Pathological differences between white and grey matter multiple sclerosis lesions. *Ann N Y Acad Sci.* 2015; 1351: 99-113.
3. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M and Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol.* 2000; 47: 707-17.
4. Dargahi N, Katsara M, Tselios T, et al. Multiple Sclerosis: Immunopathology and Treatment Update. *Brain Sci.* 2017; 7.
5. Feinstein A, Freeman J and Lo AC. Treatment of progressive multiple sclerosis: what works, what does not, and what is needed. *Lancet Neurol.* 2015; 14: 194-207.
6. Harlow DE, Honce JM and Miravalle AA. Remyelination Therapy in Multiple Sclerosis. *Front Neurol.* 2015; 6: 257.
7. Hemmer B, Kerschensteiner M and Korn T. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2015; 14: 406-19.
8. Mayo L, Quintana FJ and Weiner HL. The innate immune system in demyelinating disease. *Immunol Rev.* 2012; 248: 170-87.
9. Hernandez-Pedro N, Magana-Maldonado R, Ramiro AS, et al. PAMP-DAMPs interactions mediates development and progression of multiple sclerosis. *Front Biosci (Schol Ed).* 2016; 8: 13-28.
10. Wekerle H. B cells in multiple sclerosis. *Autoimmunity.* 2017; 50: 57-60.
11. von Budingen HC, Kuo TC, Sirota M, et al. B cell exchange across the blood-brain barrier in multiple sclerosis. *J Clin Invest.* 2012; 122: 4533-43.
12. Petzold A. Intrathecal oligoclonal IgG synthesis in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2013; 262: 1-10.
13. Fitzner B, Hecker M and Zettl UK. Molecular biomarkers in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Autoimmun Rev.* 2015; 14: 903-13.
14. Bray PF, Luka J, Bray PF, Culp KW and Schlicht JP. Antibodies against Epstein-Barr nuclear antigen (EBNA) in multiple sclerosis CSF, and two pentapeptide sequence identities between EBNA and myelin basic protein. *Neurology.* 1992; 42: 1798-804.
15. Felgenhauer K, Schädlich HJ, Nekic M and Ackermann R. Cerebrospinal fluid virus antibodies. A diagnostic indicator for multiple sclerosis? *J Neurol Sci.* 1985; 71: 291-9.
16. Schubert J and Weissbrich B. Detection of virus-specific intrathecally synthesised immunoglobulin G with a fully automated enzyme immunoassay system. *BMC Neurol.* 2007; 7: 12.
17. Sandberg-Wollheim M, Vandvik B, Nadj C and Norrby E. The intrathecal immune response in the early stage of multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 1987; 81: 45-53.
18. Walvoort MT, Testa C, Eilam R, et al. Antibodies from multiple sclerosis patients preferentially recognize hyperglucosylated adhesin of non-typeable Haemophilus influenzae. *Sci Rep.* 2016; 6: 39430.
19. Vartdal F, Vandvik B and Norrby E. Viral and bacterial antibody responses in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 1980; 8: 248-55.
20. Hughes LE, Smith PA, Bonell S, et al. Cross-reactivity between related sequences found in Acinetobacter sp., Pseudomonas aeruginosa, myelin basic protein and myelin oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2003; 144: 105-15.
21. Bagos PG, Nikolopoulos G and Ioannidis A. Chlamydia pneumoniae infection and the risk of multiple sclerosis: a meta-analysis. *Mult Scler.* 2006; 12: 397-411.

22. Bahar M, Ashtari F, Aghaei M, Akbari M, Salari M and Ghalamkari S. Mycoplasma pneumonia seropositivity in Iranian patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomized case-control study. *J Pak Med Assoc.* 2012; 62: S6-8.
23. Cross AH, Trotter JL and Lyons J. B cells and antibodies in CNS demyelinating disease. *J Neuroimmunol.* 2001; 112: 1-14.
24. Dharmasaroja P. Specificity of autoantibodies to epitopes of myelin proteins in multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2003; 206: 7-16.
25. Schmidt S. Candidate autoantigens in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 1999; 5: 147-60.
26. Dasgupta S, Lavery SB and Hogan EL. 3-O-acetyl-sphingosine-series myelin glycolipids: characterization of novel 3-O-acetyl-sphingosine galactosylceramide. *J Lipid Res.* 2002; 43: 751-61.
27. Bennion B, Dasgupta S, Hogan EL and Lavery SB. Characterization of novel myelin components 3-O-acetyl-sphingosine galactosylceramides by electrospray ionization Q-TOF MS and MS/CID-MS of Li⁺ adducts. *J Mass Spectrom.* 2007; 42: 598-620.
28. Menge T, Lalive PH, von Budingen HC, Cree B, Hauser SL and Genain CP. Antibody responses against galactocerebroside are potential stage-specific biomarkers in multiple sclerosis. *J Allergy Clin Immunol.* 2005; 116: 453-9.
29. Menon KK, Piddlesden SJ and Bernard CC. Demyelinating antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein and galactocerebroside induce degradation of myelin basic protein in isolated human myelin. *J Neurochem.* 1997; 69: 214-22.
30. Fierz W, Heininger K, Schaefer B, Toyka KV, Linington C and Lassmann H. Synergism in the pathogenesis of EAE induced by an MBP-specific T-cell line and monoclonal antibodies to galactocerebroside or a myelin oligodendroglial glycoprotein. *Ann N Y Acad Sci.* 1988; 540: 360-3.
31. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol.* 2011; 69: 292-302.
32. Mata S, Lolli F, Soderstrom M, Pinto F and Link H. Multiple sclerosis is associated with enhanced B cell responses to the ganglioside GD1a. *Mult Scler.* 1999; 5: 379-88.
33. Sadatipour BT, Greer JM and Pender MP. Increased circulating antiganglioside antibodies in primary and secondary progressive multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 1998; 44: 980-3.
34. Acarin N, Rio J, Fernandez AL, et al. Different antiganglioside antibody pattern between relapsing-remitting and progressive multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand.* 1996; 93: 99-103.
35. Ilyas AA, Chen ZW and Cook SD. Antibodies to sulfatide in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2003; 139: 76-80.
36. Ryberg B. Multiple specificities of anti-brain antibodies in multiple sclerosis and chronic myelopathy. *J Neurol Sci.* 1978; 38: 357-82.
37. Brennan KM, Galban-Horcajo F, Rinaldi S, et al. Lipid arrays identify myelin-derived lipids and lipid complexes as prominent targets for oligoclonal band antibodies in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2011; 238: 87-95.
38. Sugiyama Y and Yamamoto T. Characterization of serum anti-phospholipid antibodies in patients with multiple sclerosis. *Tohoku J Exp Med.* 1996; 178: 203-15.
39. Kanter JL, Narayana S, Ho PP, et al. Lipid microarrays identify key mediators of autoimmune brain inflammation. *Nat Med.* 2006; 12: 138-43.
40. Quintana FJ, Farez MF, Viglietta V, et al. Antigen microarrays identify unique serum autoantibody signatures in clinical and pathologic subtypes of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105: 18889-94.

41. Zahringer U, Wagner F, Rietschel ET, Ben-Menachem G, Deutsch J and Rottem S. Primary structure of a new phosphocholine-containing glycolipid of *Mycoplasma fermentans*. *J Biol Chem*. 1997; 272: 26262-70.
42. Wucherpfennig KW. Mechanisms for the induction of autoimmunity by infectious agents. *J Clin Invest*. 2001; 108: 1097-104.
43. Oldstone MB. Molecular mimicry, microbial infection, and autoimmune disease: evolution of the concept. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005; 296: 1-17.
44. Sospedra M and Martin R. Molecular mimicry in multiple sclerosis. *Autoimmunity*. 2006; 39: 3-8.
45. McCoy L, Tsunoda I and Fujinami RS. Multiple sclerosis and virus induced immune responses: autoimmunity can be primed by molecular mimicry and augmented by bystander activation. *Autoimmunity*. 2006; 39: 9-19.
46. Raphael I, Nalawade S, Eagar TN and Forsthuber TG. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*. 2015; 74: 5-17.
47. Bennett JL and Stuve O. Update on inflammation, neurodegeneration, and immunoregulation in multiple sclerosis: therapeutic implications. *Clin Neuropharmacol*. 2009; 32: 121-32.
48. Hirahara K and Nakayama T. CD4+ T-cell subsets in inflammatory diseases: beyond the Th1/Th2 paradigm. *Int Immunol*. 2016; 28: 163-71.
49. Jadidi-Niaragh F and Mirshafiey A. Th17 cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis. *Scand J Immunol*. 2011; 74: 1-13.
50. Babaloo Z, Aliparasti MR, Babaiea F, Almasi S, Baradaran B and Farhoudi M. The role of Th17 cells in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: interleukin-17A and interleukin-17F serum levels. *Immunol Lett*. 2015; 164: 76-80.
51. Dos Passos GR, Sato DK, Becker J and Fujihara K. Th17 Cells Pathways in Multiple Sclerosis and Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders: Pathophysiological and Therapeutic Implications. *Mediators Inflamm*. 2016; 2016: 5314541.
52. Brucklacher-Waldert V, Stuermer K, Kolster M, Wolthausen J and Tolosa E. Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain*. 2009; 132: 3329-41.
53. Scurlock B and Dawson G. Differential responses of oligodendrocytes to tumor necrosis factor and other pro-apoptotic agents: role of ceramide in apoptosis. *J Neurosci Res*. 1999; 55: 514-22.
54. Testai FD, Landek MA and Dawson G. Regulation of sphingomyelinases in cells of the oligodendrocyte lineage. *J Neurosci Res*. 2004; 75: 66-74.
55. Buntinx M, Moreels M, Vandenabeele F, et al. Cytokine-induced cell death in human oligodendroglial cell lines: I. Synergistic effects of IFN-gamma and TNF-alpha on apoptosis. *J Neurosci Res*. 2004; 76: 834-45.
56. Buntinx M, Gielen E, Van Hummelen P, et al. Cytokine-induced cell death in human oligodendroglial cell lines. II: Alterations in gene expression induced by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *J Neurosci Res*. 2004; 76: 846-61.
57. Qin J, Berdyshev E, Goya J, Natarajan V and Dawson G. Neurons and oligodendrocytes recycle sphingosine 1-phosphate to ceramide: significance for apoptosis and multiple sclerosis. *J Biol Chem*. 2010; 285: 14134-43.
58. Wheeler D, Bandaru VV, Calabresi PA, Nath A and Haughey NJ. A defect of sphingolipid metabolism modifies the properties of normal appearing white matter in multiple sclerosis. *Brain*. 2008; 131: 3092-102.
59. Kim S, Steelman AJ, Zhang Y, Kinney HC and Li J. Aberrant upregulation of astroglial ceramide potentiates oligodendrocyte injury. *Brain Pathol*. 2012; 22: 41-57.

60. Vidaurre OG, Haines JD, Katz Sand I, et al. Cerebrospinal fluid ceramides from patients with multiple sclerosis impair neuronal bioenergetics. *Brain*. 2014; 137: 2271-86.
61. Delgado A, Casas J, Llebaria A, Abad JL and Fabrias G. Inhibitors of sphingolipid metabolism enzymes. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1758: 1957-77.
62. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, et al. Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev*. 2006; 212: 8-27.
63. Grant CR, Liberal R, Mieli-Vergani G, Vergani D and Longhi MS. Regulatory T-cells in autoimmune diseases: challenges, controversies and--yet--unanswered questions. *Autoimmun Rev*. 2015; 14: 105-16.
64. Fontenot JD, Gavin MA and Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003; 4: 330-6.
65. Curotto de Lafaille MA and Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3⁺ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity*. 2009; 30: 626-35.
66. Correale J and Farez M. Association between parasite infection and immune responses in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2007; 61: 97-108.
67. Endharti AT, Rifa IM, Shi Z, et al. Cutting edge: CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN- γ production and proliferation of CD8⁺ T cells. *J Immunol*. 2005; 175: 7093-7.
68. Rosenblum MD, Remedios KA and Abbas AK. Mechanisms of human autoimmunity. *J Clin Invest*. 2015; 125: 2228-33.
69. Adorini L. Antigen-based immunointervention in human autoimmune diseases. *Trends Biotechnol*. 2004; 22: 547-9.
70. Taniguchi M, Tashiro T, Dashtsoodol N, Hongo N and Watarai H. The specialized iNKT cell system recognizes glycolipid antigens and bridges the innate and acquired immune systems with potential applications for cancer therapy. *Int Immunol*. 2010; 22: 1-6.
71. Illes Z, Kondo T, Newcombe J, Oka N, Tabira T and Yamamura T. Differential expression of NK T cell V alpha 24J alpha Q invariant TCR chain in the lesions of multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Immunol*. 2000; 164: 4375-81.
72. Demoulin T, Gachelin G, Bequet D and Dormont D. A biased Valpha24⁺ T-cell repertoire leads to circulating NKT-cell defects in a multiple sclerosis patient at the onset of his disease. *Immunol Lett*. 2003; 90: 223-8.
73. Araki M, Kondo T, Gumperz JE, Brenner MB, Miyake S and Yamamura T. Th2 bias of CD4⁺ NKT cells derived from multiple sclerosis in remission. *Int Immunol*. 2003; 15: 279-88.
74. Rinaldi L, Gallo P, Calabrese M, et al. Longitudinal analysis of immune cell phenotypes in early stage multiple sclerosis: distinctive patterns characterize MRI-active patients. *Brain*. 2006; 129: 1993-2007.
75. Jahng AW, Maricic I, Pedersen B, et al. Activation of natural killer T cells potentiates or prevents experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*. 2001; 194: 1789-99.
76. Mycko MP, Sliwinska B, Cichalewska M, Cwiklinska H, Raine CS and Selmaj KW. Brain glycolipids suppress T helper cells and inhibit autoimmune demyelination. *J Neurosci*. 2014; 34: 8646-58.
77. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S and Bo L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 1998; 338: 278-85.
78. Kuhlmann T, Lingfeld G, Bitsch A, Schuchardt J and Bruck W. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain*. 2002; 125: 2202-12.
79. Mahad DH, Trapp BD and Lassmann H. Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2015; 14: 183-93.

80. Correale J. The role of microglial activation in disease progression. *Mult Scler.* 2014; 20: 1288-95.
81. Balasubramaniam B, Carter DA, Mayer EJ and Dick AD. Microglia derived IL-6 suppresses neurosphere generation from adult human retinal cell suspensions. *Exp Eye Res.* 2009; 89: 757-66.
82. Dheen ST, Jun Y, Yan Z, Tay SS and Ling EA. Retinoic acid inhibits expression of TNF-alpha and iNOS in activated rat microglia. *Glia.* 2005; 50: 21-31.
83. Levesque S, Wilson B, Gregoria V, et al. Reactive microgliosis: extracellular micro-calpain and microglia-mediated dopaminergic neurotoxicity. *Brain.* 2010; 133: 808-21.
84. Kim YS, Kim SS, Cho JJ, et al. Matrix metalloproteinase-3: a novel signaling proteinase from apoptotic neuronal cells that activates microglia. *J Neurosci.* 2005; 25: 3701-11.
85. Islam MT. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurol Res.* 2017; 39: 73-82.
86. Liu B, Gao HM, Wang JY, Jeohn GH, Cooper CL and Hong JS. Role of nitric oxide in inflammation-mediated neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 962: 318-31.
87. Biber K, Neumann H, Inoue K and Boddeke HW. Neuronal 'On' and 'Off' signals control microglia. *Trends Neurosci.* 2007; 30: 596-602.
88. Lull ME and Block ML. Microglial activation and chronic neurodegeneration. *Neurotherapeutics.* 2010; 7: 354-65.
89. Rasmussen S, Wang Y, Kivisakk P, et al. Persistent activation of microglia is associated with neuronal dysfunction of callosal projecting pathways and multiple sclerosis-like lesions in relapsing--remitting experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain.* 2007; 130: 2816-29.
90. Vainchtein ID, Vinet J, Brouwer N, et al. In acute experimental autoimmune encephalomyelitis, infiltrating macrophages are immune activated, whereas microglia remain immune suppressed. *Glia.* 2014; 62: 1724-35.
91. Ray SK and Banik NL. Calpain and its involvement in the pathophysiology of CNS injuries and diseases: therapeutic potential of calpain inhibitors for prevention of neurodegeneration. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 2003; 2: 173-89.
92. Guyton MK, Wingrave JM, Yallapragada AV, et al. Upregulation of calpain correlates with increased neurodegeneration in acute experimental auto-immune encephalomyelitis. *J Neurosci Res.* 2005; 81: 53-61.
93. Guyton MK, Das A, Samantaray S, et al. Calpeptin attenuated inflammation, cell death, and axonal damage in animal model of multiple sclerosis. *J Neurosci Res.* 2010; 88: 2398-408.
94. Trinchese F, Fa M, Liu S, et al. Inhibition of calpains improves memory and synaptic transmission in a mouse model of Alzheimer disease. *J Clin Invest.* 2008; 118: 2796-807.
95. Vosler PS, Brennan CS and Chen J. Calpain-mediated signaling mechanisms in neuronal injury and neurodegeneration. *Mol Neurobiol.* 2008; 38: 78-100.
96. Guyton MK, Brahmachari S, Das A, et al. Inhibition of calpain attenuates encephalitogenicity of MBP-specific T cells. *J Neurochem.* 2009; 110: 1895-907.
97. Butler JT, Samantaray S, Beeson CC, Ray SK and Banik NL. Involvement of calpain in the process of Jurkat T cell chemotaxis. *J Neurosci Res.* 2009; 87: 626-35.
98. Trager N, Butler JT, Haque A, Ray SK, Beeson C and Banik NL. The Involvement of Calpain in CD4+ T Helper Cell Bias in Multiple Sclerosis. *J Clin Cell Immunol.* 2013; 4: 1000153.
99. Imam SA, Guyton MK, Haque A, et al. Increased calpain correlates with Th1 cytokine profile in PBMCs from MS patients. *J Neuroimmunol.* 2007; 190: 139-45.

100. Shields DC, Schaecher KE, Saido TC and Banik NL. A putative mechanism of demyelination in multiple sclerosis by a proteolytic enzyme, calpain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96: 11486-91.
101. Ray SK and Banik NL. Calpain and its involvement in the pathophysiology of CNS injuries and diseases: therapeutic potential of calpain inhibitors for prevention of neurodegeneration. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 2003; 2: 173-89.
102. Smith AW, Doonan BP, Tyor WR, Abou-Fayssal N, Haque A and Banik NL. Regulation of Th1/Th17 cytokines and IDO gene expression by inhibition of calpain in PBMCs from MS patients. *J Neuroimmunol*. 2011; 232: 179-85.
103. Blomgren K, Zhu C, Wang X, et al. Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia: a mechanism of "pathological apoptosis"? *J Biol Chem*. 2001; 276: 10191-8.
104. Witkowski JM, Zmuda-Trzebiatowska E, Swiercz JM, et al. Modulation of the activity of calcium-activated neutral proteases (calpains) in chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells. *Blood*. 2002; 100: 1802-9.
105. Murphy AC, Lalor SJ, Lynch MA and Mills KH. Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun*. 2010; 24: 641-51.
106. Friesse MA and Fugger L. T cells and microglia as drivers of multiple sclerosis pathology. *Brain*. 2007; 130: 2755-7.
107. Doring A and Yong VW. The good, the bad and the ugly. Macrophages/microglia with a focus on myelin repair. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2011; 3: 846-56.
108. Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M and Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev*. 2011; 91: 461-553.
109. Kouskoff V, Signorelli K, Benoist C and Mathis D. Cassette vectors directing expression of T cell receptor genes in transgenic mice. *J Immunol Methods*. 1995; 180: 273-80.
110. von Budingen HC, Harrer MD, Kuenzle S, Meier M and Goebels N. Clonally expanded plasma cells in the cerebrospinal fluid of MS patients produce myelin-specific antibodies. *Eur J Immunol*. 2008; 38: 2014-23.