



Katedra i Zakład Immunologii Medycznej
Wydział Lekarski
Gdański Uniwersytet Medyczny

Autoreferat

Dr n. chem. Dorota Iwaszkiewicz-Grześ

Gdańsk, 2021

1. Imię i nazwisko

Dorota Iwaszkiewicz-Grześ

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

Tytuł zawodowy: magister inżynier	Politechnika Gdańska; Wydział Chemiczny; Kierunek Biotechnologia; Specjalność: Technologia, Biotechnologia i Analiza Żywności; 06 lipca 2010	Tytuł pracy magisterskiej: <i>„Synteza kombretastatyny A-4”</i> Promotor: prof. dr hab. inż. Krystyna Dzierzbicka
Stopień naukowy: doktor nauk chemicznych Dyscyplina naukowa: Chemia	Politechnika Gdańska; Wydział Chemiczny; Katedra Chemii Organicznej; 05 listopada 2014	Tytuł rozprawy doktorskiej: <i>„Synteza i badania biologiczne nowych aminokwasowych analogów kwasu mykofenolowego”</i> Promotor: prof. dr hab. inż. Krystyna Dzierzbicka Promotor: prof. dr hab. Piotr Trzonkowski

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych

Katedra i Zakład Immunologii Medycznej Wydział Lekarski Gdański Uniwersytet Medyczny	od 04.01.2019	Adiunkt (pracownik badawczo-dydaktyczny)
	od 01.02.2016 do 03.01.2019	Adiunkt (pracownik naukowy)
PolTREG S.A. Spin-off Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego	od 28.05.2018	Biotechnolog Lider ds. Badań i Rozwoju
Dzienne Studia Doktoranckie Politechniki Gdańskiej, Wydział Chemiczny, Katedra Chemii Organicznej	od 01.10.2010 do 05.11.2014	Doktorantka

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2b Ustawy

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Udoskonalanie terapii komórkowej limfocytami T regulatorowymi w chorobach autoimmunologicznych

4.2. Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Cykl habilitacyjny

	IF	MEiN	Liczba cytowań
1 Chwojncki K.#; Iwaszkiewicz-Grześ D.# ; Jankowska A.#; Zieliński M.; Łowiec P.; Gliwiński M.; Grzywińska M.; Kowalczyk K.; Konarzewska A.; Glasner P; Sakowska J.; Kulczycka J.; Jaźwińska-Curyłło A.; Kubach M.; Karaszewski B.; Nyka W.; Szurowska E.; Trzonkowski P, „Administration of CD4+CD25highCD127-foxp3+ regulatory T cells for relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase I study”, BioDrugs , 2021, 35(1), 47-60	5,807	100	5
2 Iwaszkiewicz-Grzes D.# ✉, Gliwinski M.#, Eugster A., Piotrowska M., Dahl A., Marek-Trzonkowska N., Trzonkowski P.✉, „Antigen-reactive regulatory T cells can be expanded in vitro with monocytes and anti-CD28 and anti-CD154 antibodies”, CYTOTHERAPY , 2020, 22(11), 629-641	5,414	100	3
3 Iwaszkiewicz-Grzes D.# , Piotrowska M.#, Gliwinski M., Urban-Wójciuk Z., Trzonkowski P., „Antigenic challenge influences epigenetic changes in antigen-specific T regulatory cells”, Frontiers in Immunology , section Immunological Tolerance and Regulation, 2021, 12, 642-678	7,561	140	1
Razem	18,782	340	9

autor równorzędny

✉ autor korespondencyjny

4.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wprowadzenie

Limfocyty T regulatorowe (Tregs) stanowią populację, której rolą jest regulowanie i tłumienie nadmiernych odpowiedzi innych komórek układu odpornościowego. Są one zdolne do kontrolowania różnych innych subpopulacji komórek, m.in. aktywowanych komórek efektorowych (Tconv) i prezentujących antygeny (APC), komórek NK, B, jak i odporności wrodzonej¹⁻³. Pomimo, iż już w latach siedemdziesiątych Gershon i Kondo⁴ przedstawili hipotezę o istnieniu populacji komórek regulujących układ odpornościowy, to dopiero w 1995 roku została ona potwierdzona. Wykorzystano w tym celu model myszy, na podstawie którego udowodniono, że brak limfocytów T regulatorowych powoduje autoimmunologiczną dysfunkcję wielu narządów⁵. Również zespół IPEX (Zespół dysregulacji immunologicznej, poliendokrynopatii i enteropatii sprzężony z chromosomem X) u ludzi został później również powiązany z mutacją genu *Foxp3*, głównego regulatora Tregs⁶. Tregs odpowiedzialne za tą jednostkę chorobową charakteryzują się fenotypem CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺, wywodzą się z grasicy i są często nazywane naturalnymi limfocytami T regulatorowymi (nTregs lub tTregs). Pomimo istnienia limfocytów Tregs o różnym pochodzeniu, to właśnie nTreg przyciągają uwagę jako potencjalny lek komórkowy. Jest to m.in. związane z ich stabilnością i wyraźnym działaniem immunosupresyjnym w przypadku administracji *in vivo*⁷.

Od momentu odkrycia immunoregulacyjnej aktywności limfocytów T regulatorowych, próbowano je wykorzystać w leczeniu. Pomysł ten został wstępnie zweryfikowany na modelach zwierzęcych poprzez adopcyjny transfer komórek między zwierzętami. Wczesne doniesienia dowiodły, że transfer Tregs związany z przeszczepem hematopoetycznych komórek macierzystych (HSCT) u myszy, chroni je przed chorobą przeszczep przeciwko gospodarzowi (GvHD) i promuje efekt przeszczep przeciwko białaczce (GvL)⁸. Niestety, w przypadku ludzi, w celu uzyskania podobnych efektów klinicznych, wymagane jest podanie dużej liczby tych komórek⁹. Dodatkowo ich niska liczba we krwi obwodowej stanowi kolejne wyzwanie dla naukowców. W związku z tym opracowano procedury wytwarzania, umożliwiające ekspansję Tregs *in vitro* przed podaniem pacjentowi. Mianowicie, niewielką liczbę komórek Tregs wyizolowanych od dawcy hoduje się w określonych warunkach, aby wymusić proliferację przed przeniesieniem do biorcy. Metoda ta ma tę zaletę, że produkt może

być na bieżąco analizowany pod kątem aktywności funkcjonalnej i fenotypowej, a dawka może być precyzyjnie kontrolowana. Testy na modelach zwierzęcych wykazały, że taka ekspansja jest możliwa i zarówno komórki poliklonalne, jak i specyficzne były zdolne do indukowania stanu wolnego od GvHD po przeszczepie szpiku kostnego¹⁰. Na modelach zwierzęcych potwierdzono również, że takie komórki mają dobre zdolności supresyjne przy przeszczepianiu narządów mięszzowych, w tym u naczelnych innych niż człowiek¹¹⁻¹³.

Poza przeszczepami, terapię testowano również na zwierzęcych modelach chorób autoimmunologicznych. W tym przypadku zdarzenie inicjujące i antygeny odpowiedzialne za wywołanie odpowiedzi nie zawsze są jasne, a zatem modele zwierzęce w mniejszym stopniu naśladują choroby ludzkie. Zebrano jednak pewne solidne dowody potwierdzające, że przeniesienie autoimmunologicznych przeciwwyspowych limfocytów T od zwierząt z cukrzycą do wcześniej zdrowych zwierząt wywołało zapalenie wysp trzustkowych i cukrzycę typu 1 (T1DM)¹⁴. Ponadto, myszy z cukrzycą bez otyłości (NOD), które spontanicznie nabywają T1DM z powodu upośledzenia Tregs¹⁵, można leczyć adoptywnym transferem Tregs, które przemieszczają się do trzustki i tłumią komórki Tconv reagujące na wysepki¹⁶.

Poza cukrzycą, udział Tregs potwierdzono w przypadku stwardnienia rozsianego (MS)¹⁷. Dodatkowo, autoimmunizacja w SM jest łatwa do prześledzenia ze względu na główne autoantygeny związane z chorobą – białka budujące mielinę¹⁸. Uczulenie myszy tymi białkami powoduje rozwój eksperymentalnego autoimmunologicznego zapalenia mózgu i rdzenia (EAE), odpowiednika ludzkiego stwardnienia rozsianego. Co ciekawe, remisja lub zapobieganie EAE było związane z indukcją komórek Tregs CD4⁺CD25⁺.¹⁹ Hipoteza ta została dodatkowo potwierdzona przez adoptywny transfer Tregs: administracja komórek przed indukcją EAE zapobiegała rozwojowi choroby, a przeniesienie komórek do zwierząt, które już rozwinęły EAE, łagodziło objawy²⁰. Podobne obserwacje dotyczące leczniczej roli adoptywnego transferu Tregs zostały zgłoszone w zwierzęcych modelach zapalenia wielonarządowego²¹.

Po potwierdzeniu terapeutycznego potencjału Tregs w wielu badaniach na zwierzętach rozpoczęto pierwsze badania kliniczne²². Najistotniejszym czynnikiem przemawiającym za przeniesieniem Tregs do kliniki był fakt, że wydają się one zachowywać wszystkie zalety standardowej immunosupresji bez dodatkowych działań niepożądanych²³. Terapia Tregs została w pewnym stopniu wprowadzona wraz z lekami abatacept i belatacept, które są białkami fuzyjnymi zawierającymi ugrupowanie receptora CTLA-4, odpowiedzialnego za główne zdolności supresyjne Tregs. Co ciekawe, skuteczność tych leków jako

podtrzymującej immunosupresji po przeszczepieniu narządu litego oraz w leczeniu chorób autoimmunologicznych została już potwierdzona²⁴⁻²⁶. Dodatkowo odnotowano kliniczne wzmocnienie działania wielu innych leków poprzez zwiększoną aktywność Tregs^{27,28}.

Ostatecznie Tregs wykorzystywane są jako lek komórkowy i obecnie przeprowadzanych jest na całym świecie około 40 badań klinicznych z ich udziałem²⁹. Istnieją różne cele kliniczne tej terapii, takie jak terapia/zapobieganie chorobie przeszczep przeciwko gospodarzowi (GVHD)³⁰, autoimmunizacja i indukcja tolerancji w allotransplantacji^{30,31}, czy inne. Nasza grupa badawcza prowadzi badania nad biologią i klinicznym zastosowaniem Tregs od ponad 20 lat, głównie w stanach autoimmunologicznych, takich jak wspomniane wcześniej cukrzyca typu 1 i stwardnienie rozsiane^{29,32-34}, co również jest przedmiotem przedstawionego cyklu habilitacyjnego.

Cel naukowy prezentowanego osiągnięcia

1. Zbadanie efektywności i bezpieczeństwa działania poliklonalnych limfocytów T regulatorowych w stwardnieniu rozsianym oraz wpływu miejsca administracji komórek na progres choroby;
2. Opracowanie metody otrzymania antygenowo-specyficznych limfocytów T regulatorowych na przykładzie cukrzycy typu 1;
3. Porównanie efektywności działania antygenowo-specyficznych i poliklonalnych limfocytów T regulatorowych;
4. Ocena molekularna otrzymanych antygenowo-specyficznych i poliklonalnych limfocytów T regulatorowych.

Omówienie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Omawiane prace powstały w wyniku realizacji projektów NCBiR: LIDER/160/L-6/14/NCBR/2015, którego byłam kierownikiem oraz STRATEGMED1/233368/1/NCBR/2014, w którym byłam koordynatorem zadania 4 oraz wykonawcą przez cały okres trwania projektu. Współautorzy wszystkich publikacji wyrazili zgodę na ich wykorzystanie w niniejszej rozprawie i określili swój wkład w powstanie poszczególnych prac (Załącznik).

Publikacja 1

Chwojnicky K.#; Iwaszkiewicz-Grześ D.#; Jankowska A.#; Zieliński M.; Łowiec P.; Gliwiński M.; Grzywińska M.; Kowalczyk K.; Konarzewska A.; Glasner P.; Sakowska J.; Kulczycka J.; Jaźwińska-Curyło A.; Kubach M.; Karaszewski B.; Nyka W.; Szurowska E.; Trzonkowski P, „Administration of CD4+CD25highCD127-foxp3+ regulatory T cells for relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase I study”, *BioDrugs*, 2021, 35(1), 47-60

Pierwsza z omawianych prac miała na celu zbadanie bezpieczeństwa i efektywności poliklonalnych limfocytów T regulatorowych podanych pacjentom ze stwardnieniem rozsianym oraz porównanie miejsca administracji preparatu, wlewu dożylnego oraz dokanałowego, na progres choroby

Interwencja immunologiczna w SM jest obecnie leczeniem z wyboru. Chociaż neurodegeneracja jest głównym problemem i ostatecznie odpowiada za objawy, to nieprawidłowo działający układ odpornościowy jest główną przyczyną choroby. Dodatkowo, obecność autouczulanych komórek Tconv nie wyjaśnia w pełni początku choroby, ponieważ komórki te wykryto również u osób zdrowych³⁵. Wiadomo jednak, że jest to rozregulowanie pomiędzy populacjami Tregs i Tconv, które ostatecznie wyzwała klinicznie istotną autoimmunizację w SM³⁶. U chorych pacjentów, w porównaniu ze zdrową kontrolą, stwierdzono raczej zmniejszoną aktywność komórek Tregs niż różnicę w ich liczbie. Co ciekawe, upośledzenie funkcji supresyjnej odnotowano raczej w postaci rzutowo-remisyjnej, niż w postaci wtórnie postępującej MS^{37,38}. Stwierdzono również akumulację komórek Tregs w płynie mózgowo-rdzeniowym, a nie we krwi pacjentów w okresie remisji, co sugeruje rzeczywiste miejsce zapalenia³⁹. Biorąc pod uwagę powyższe informacje, istnieje wyraźne wskazanie do wykorzystania komórek Tregs jako narzędzia terapeutycznego, co staraliśmy się zweryfikować w przedstawionej pracy.

Do badania włączono pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią SM, zdiagnozowaną zgodnie z kryteriami McDonalda lub zrewidowanymi kryteriami McDonalda^{40,41}, którzy zostali losowo przydzieleni do dożylnego lub dokanałowego podania preparatu. Najważniejszym kryterium wykluczenia była jakakolwiek terapia immunosupresyjna podana do 6 miesięcy przed podaniem preparatu.

Obserwację rozpoczęto po podaniu komórek Tregs i trwała ona przez kolejne 12 miesięcy (5 punktów kontrolnych). Mierzone punkty końcowe obejmowały liczbę i nasilenie skutków ubocznych terapii, liczbę rocznych nawrotów, pogorszenie w skali EDSS o co najmniej 1 punkt, zmiany w skali Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC), zmiany w obrazowaniu metodą rezonansu magnetycznego (MRI), immunofenotypie

limfocytów krwi obwodowej i poziomie cytokin w surowicy. Projekt badania był zgodny z „Guideline on Clinical Trials in Small Populations”⁴² oraz uzyskał opinie i aprobatę odpowiedniej komisji bioetycznej.

Czternastu pacjentów z SM (18-55 lat) zostało włączonych do badania oraz podzielonych na grupę leczoną komórkami Tregs dożylnie (grupa IV, n = 11) lub dokanałowo (podpajęczynówkowo) (grupa IT, n = 3).

Wytwarzanie preparatu prowadzono w warunkach Dobrej Praktyki Wytwarzania (GMP) rozpoczynając od wyizolowania z krwi żyłnej obwodowej pacjentów limfocytów T regulatorowych na podstawie fenotypu $CD3^+CD4^+CD25^{high}CD127^{-}lin^{-}dublet^{-}$ z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych klasy GMP. Średnia czystość po sortowaniu wynosiła $\approx 98\%$.

W celu podania dożylnego, namnażanie komórek prowadzono przy użyciu kulek o jakości klinicznej anty-CD3/anty-CD28, interleukiny (IL)-2 i autologicznej, inaktywowanej surowicy przez okres do 14 dni^{27,33,43,44}. Wykonywano również test supresji interferonu $IFN\gamma^{45}$, w celu potwierdzenia, że jego produkcja nigdy nie przekroczyła 2%. Bezpieczeństwo produktu zostało potwierdzone negatywnymi wynikami hodowli mikrobiologicznych z pożywek ekspansyjnych, negatywnymi testami endotoksyny, barwieniem Gram oraz brakiem materiału genetycznego HBV, HCV, HIV-1 i HIV-2 (Cobas MPX, Roche, Europa). Gotowy do użycia preparat podawano w ciągu 2 godzin od uwolnienia z Banku Tkanek i Komórek. Ostateczna dawka wynosiła 40×10^6 komórek Tregs na kg masy ciała pacjenta i była podawana po zawieszeniu w 0,9% NaCl do wstrzykiwań w powolnym wlewie dożylnym.

W podaniu dokanałowym, 1×10^6 świeżo wyizolowanych komórek Tregs (komórki nie były poddawane ekspansji) było poddanych takiej samej kontroli jakości i testom, jak komórki podawane dożylnie, zgodnie z kryteriami uwalniania, a następnie zawieszane w 10 ml 0,9% NaCl. Następnie preparat podawano w powolnym zastrzyku podczas nakłucia lędźwiowego.

W celu zbadania odpowiedzi przeprowadzono fenotypowanie immunologiczne, w celu śledzenia zarówno Tregs o fenotypie $CD3^+CD4^+CD25^{high}CD127^{-}FoxP3^+$, jak i Tconv o fenotypie $CD3^+CD4^+CD25^{low/-}CD127^{+}FoxP3^{-}$ we krwi obwodowej. W obu populacjach śledzono ekspresję antygenów ważnych dla pełnienia funkcji. Określono odsetek podzbiorów komórek naiwnych/pamięci w oparciu o następujące fenotypy: naiwne (Tn) ($CD62L^+CD45RA^+$), pamięci centralnej (Tcm) ($CD62L^+CD45RA^{-}$) i pamięci efektorowej (Tem) ($CD62L^{-}CD45RA^{-}$). Komórki Tregs podzielono również na podstawie ekspresji

czynnika transkrypcyjnego Helios⁴⁶. Oceniono również poziomy 38 cytokin w surowicy wykorzystując analizator Luminex.

Analiza fenotypów Tregs wykazała zaskakująco wysoki odsetek obwodowych komórek Helios(-) Tregs w całkowitej puli limfocytów T regulatorowych u wszystkich pacjentów z SM. Nie zaobserwowaliśmy istotnych zmian w poziomie komórek FoxP3⁺ Tregs i Tconv w okresie obserwacji pacjentów, jednak komórki Tregs różniły się od Tconv w kilku zmierzonych parametrach u wszystkich pacjentów, niezależnie od drogi administracji preparatu. Komórki Tregs zawierały głównie fenotyp Tcm, podczas gdy Tconv zawierały głównie fenotyp Tn. Zwykle jest odwrotnie, ponieważ komórki Tconv są głównymi bojownikami przeciwko infekcjom lub akceleratorom autoimmunizacji, które szybko zamieniają je w komórki pamięci, podczas gdy komórki Tregs wymagają naiwnego fenotypu dla lepszej wydajności układu odpornościowego. Wysoki procent populacji Tregs pamięci sugeruje, że są one aktywnie zaangażowane w odpowiedzi immunologiczne. Może to również wyjaśniać upośledzoną funkcję supresyjną tych komórek po klinicznym wystąpieniu choroby³⁷. Wykazano również, że komórki Tregs charakteryzowały się ekspresją kilku receptorów, m.in. CCR10, CXCR4, CCR4, CD103, CD39, CTLA-4 i 4-1BB, które były prawie niewykrywalne w komórkach Tconv. Ponadto około 20% komórek Tregs nie wykazywało ekspresji czynnika transkrypcyjnego Helios, co sugeruje ich pochodzenie obwodowe. Mając to na uwadze, przeprowadzono analizę, dzieląc komórki Tregs na komórki grasicy FoxP3⁺Helios⁺ (tTregs) i obwodowe FoxP3⁺ Helios⁻ (pTregs). Populacja tTregs zawierała wyższy odsetek komórek CCR10⁺, CD103⁺, CD73⁺ i CD39⁺, podczas gdy pTregs zawierały wyższy odsetek komórek CTLA-4. Analiza z wykorzystaniem mapy ciepła potwierdziła, że wyższa ekspresja CCR10, CD103 i CD39 oraz niższa ekspresja receptorów CTLA-4 różni komórki grasicze od obwodowych.

Porównując pacjentów leczonych dożylnie (IV), osoby leczone dokanałowo (IT) wykazywały wyższe poziomy niektórych czynników związanych z zapaleniem, takich jak MCP3, IL-1RA i IL-8. Co ciekawe, poziom mózgowego czynnika troficznego TGFα był również wyższy w grupie IT niż w IV.

Stan kliniczny pacjentów ocenianych za pomocą skali EDSS nie różnił się między grupami w całym badaniu. Analiza porównań podłużnych przeprowadzona dla każdej z grup z osobna wykazała istotny wzrost wyniku EDSS tylko w grupie IV. Roczne pogorszenie skali EDSS w grupie IT i IV wyniosło odpowiednio 0 do 0,3 i 0 do 1. W grupie IV trzech na dziesięciu badanych (30%) miało pogorszenie powyżej 1 punktu w skali EDSS. Takiego pogorszenia nie zaobserwowano u osób leczonych dokanałowo (0%). W sumie u 5 chorych

leczonych dożylnie (50%), z częstością 1–3 epizodów rocznie w okresie obserwacji, odnotowano 12 nawrotów. Jednocześnie nie zaobserwowano nawrotów w grupie IT (0%). Również porównanie skanów MRI wykazało niższą aktywność choroby w grupie leczonej dokanałowo.

Wszystkie powyższe wyniki przemawiają za podawaniem komórek Tregs bezpośrednio do ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Co ciekawe, dokanałowa administracja preparatu w badaniu nie była związana ze znaczną liczbą zdarzeń niepożądanych. Ponadto, u pacjentów leczonych w ten sposób nie odnotowano istotnego pogorszenia ich stanu klinicznego, co zostało potwierdzone brakiem progresji w obrazach MRI. W porównaniu z pacjentami leczonymi dożylnie, postęp choroby był wolniejszy. Jeśli to prawda, potwierdza to, że miejscowe zapalenie jest najważniejszym celem leczenia tej choroby w klinice. Obecnie SM diagnozuje się głównie w momencie wystąpienia klinicznego. Zwykle wcześniejsze etapy ogólnoustrojowe patogenezы są pomijalne z punktu widzenia leczenia, ponieważ samopodtrzymujący się stan zapalny układu nerwowego w OUN już się rozwinął. Z oczywistych względów nie mogliśmy prześledzić proporcji komórek i czynników rozpuszczalnych w OUN dotkniętych miejscowym stanem zapalnym, zaś mogliśmy jedynie prześledzić je we krwi obwodowej pacjentów. Co ciekawe, pomimo lepszego profilu klinicznego, grupa leczona dokanałowo charakteryzowała się wyższym poziomem czynników prozapalnych niż pacjenci leczeni dożylnie. Potwierdza to, że zmiany systemowe mogą nie odpowiadać dotkliwości zmian lokalnych.

*Publikacja została **nagrodzona** „Nagrodą Specjalną Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego” w 2021 roku.*

Publikacja 2

Iwaszkiewicz-Grzes D.#✉, Gliwinski M.#, Eugster A., Piotrowska M., Dahl A., Marek-Trzonkowska N., Trzonkowski P.✉, „*Antigen-reactive regulatory T cells can be expanded in vitro with monocytes and anti-CD28 and anti-CD154 antibodies*”, CYTOTHERAPY, 2020, 22(11), 629-641

W drugiej z prezentowanych prac oryginalnych skupiłam się na opracowaniu metody otrzymywania antygenowo-specyficznych limfocytów T regulatorowych. Funkcję otrzymanych limfocytów porównałam do tych o charakterze poliklonalnym, które są z powodzeniem obecnie używane w leczeniu cukrzycy typu 1 u dzieci oraz, jak wskazałam w Publikacji 1, są na etapie badań w przypadku stwardnienia rozsianego.

W artykule opisano sposób, który umożliwia przygotowanie *in vitro* komórek Tregs odpowiadających na prezentowany antygen o potencjalnym zastosowaniu klinicznym w leczeniu chorób autoimmunologicznych. Przedstawiono sposób izolacji Tregs rozpoznających antygeny ważne w cukrzycy typu 1 (T1D), mianowicie insulinę lub fragment 9–23 łańcucha β insuliny. Metoda ta może być jednak z powodzeniem wykorzystana do wytwarzania preparatu o swoistości wobec dowolnego innego autoantygeny i zastosowana w leczeniu takich chorób jak stwardnienie rozsiane czy reumatoidalne zapalenie stawów.

Otrzymane komórki analizowano pod kątem ich zdolności supresorowych w testach funkcjonalnych mierzących stopień proliferacji oraz wydzielania interferonu gamma (IFN γ). Dodatkowo zsekwencjonowano łańcuchy receptora komórek T α (TCR α) w celu określenia różnic repertuaru TCR populacji poliklonalnych oraz antygenowo-specyficznych.

W publikacji wykorzystano materiał pochodzący od zdrowych dawców otrzymany z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Leczenia Krwi w Gdańsku. Otrzymane kożuszki leukocytarne posłużyły do izolacji magnetycznej monocytów oraz komórek CD4⁺, które następnie wykorzystując sorter komórkowy sortowano na dwie populacje: limfocyty T regulatorowe o fenotypie CD3⁺CD4⁺CD25^{high}CD127⁻/lin⁻doublet⁻ oraz limfocyty T efektorowe (Teffs) o fenotypie CD3⁺CD4⁺CD25⁻CD127⁺/lin⁻doublet⁻. W tym samym czasie monocytów stymulowano za pomocą wybranego antygeny przez 24h.

Po 24h, otrzymane komórki Tregs i Teffs wybarwiano wykorzystując barwnik fluorescencyjny CFSE, który w dalszym etapie posłużył jako wskaźnik poziomu proliferacji. Przygotowano kohodowlę Tregs/monocyty, Teffs/monocyty oraz hodowle poliklonalne. Komórki poliklonalne, zostały przygotowywane w taki sam sposób jak w przypadku podania dożylnego w Publikacji 1.

Po 7 dniach, izolowano komórki antygenowo-specyficzne, czyli proliferujące w odpowiedzi na prezentowany antygen. Komórki nieproliferujące określono jako antygenowo-niespecyficzne. Następnie wykonano testy funkcjonalne w celu porównania aktywności otrzymanych populacji.

Otrzymane wyniki pokazały, że najlepsze rezultaty otrzymano stymulując Tregs za pomocą monocytów prezentujących antygen oraz przeciwciałami anti-CD28/anti-CD154. Jednocześnie, w porównaniu z całą insuliną, stymulacja peptydem 9-23 doprowadziła do znacznie wyższego odsetka proliferacji, co prawdopodobnie jest związane z wyższym poziomem immunogenności tego fragmentu.

We wszystkich hodowlach odsetek limfocytów FoxP3⁺ nie spadł poniżej 90%, podczas gdy ekspresja FoxP3^{high} wynosiła od 16% do 79%. Najwyższą ekspresję czynnika

transkrypcyjnego FoxP3 zaobserwowano w komórkach poliklonalnych i stymulowanych peptydem wraz z przeciwciałami anti-CD28/anti-CD154. Odsetek ten był znacząco wyższy w populacjach proliferujących niż nieproliferujących. Jakość komórek potwierdzałam również oznaczając receptor CD62L, którego poziom ekspresji zawsze wynosił ponad 85%.

Skuteczność antygenowo-specyficzných komórek oceniono w testach funkcjonalnych, w których badano hamowanie proliferacji i sekrecji interferonu w komórkach odpowiadających (responderach). Przeprowadzono dwa zestawy testów, różniące się rodzajem respondera. Wykorzystano Teffs poliklonalne (niestymulowane antygenami), bądź specyficzne względem antygeny. Uzyskane wyniki sugerowały efekt supresyjny wywierany przez większość subpopulacji, przy czym komórki specyficzne wobec peptydu 9-23 wywierały silniejszy efekt na obie populacje responderów, niż miało to miejsce w przypadku insuliny.

Wydzielanie IFN γ przez poliklonalne komórki Teffs było skuteczniej tłumione przez Tregs specyficzne wobec peptydu 9-23, niż insuliny. Podobną różnicę zaobserwowano, gdy responderami były komórki specyficzne Teffs, jednak różnica nie osiągnęła istotności statystycznej. Jednocześnie, Tregs niespecyficzne tłumili wydzielanie IFN γ znacznie słabiej, niż komórki specyficzne wobec peptydu 9-23, gdy responderami były zarówno komórki specyficzne, jak i poliklonalne. Silniejsze hamowanie zaobserwowano również w przypadkach Tregs specyficznych wobec insuliny, w porównaniu z niespecyficznymi limfocytami, jednak zależność ta była widoczna tylko w przypadku specyficznych responderów. Wszystkie wyniki potwierdzono również testami ELISpot IFN γ .

Dzięki współpracy z Politechniką w Dreźnie, oceniono repertuar TCR α otrzymanych populacji. Uzyskane po stymulacji całą insuliną lub peptydem 9-23 wyniki były zaskakujące ze względu na różnorodność i klonalność, które były bardzo zmienne pomiędzy metodami i próbkami. Mimo to, zgodnie z oczekiwaniami, repertuar TCR α w komórkach antygenowo-specyficzných, zawierał mniej klonotypów niż limfocyty poliklonalne i niespecyficzných.

*Opracowana metoda otrzymywania antygenowo-specyficzných limfocytów T regulatorowych została **opatentowana** w 2021 roku („Sposób otrzymywania in vitro antygenowo specyficzných limfocytów T regulatorowych” WIPO ST 10/C PL430932, WO2021034208). Dodatkowo publikacja została **wyróżniona** w konkursie o Nagrodę Oddziału PAN w Gdańsku dla młodych naukowców za najlepszą pracę twórczą opublikowaną w 2020 r.*

Publikacja 3

Iwaszkiewicz-Grzes D.#, Piotrowska M.#, Gliwinski M., Urban-Wójciuk Z., Trzonkowski P., „*Antigenic challenge influences epigenetic changes in antigen-specific T regulatory cells*”, *Frontiers in Immunology*, section Immunological Tolerance and Regulation, 2021,12:642678

Trzecia z prezentowanych prac jest kontynuacją badań przedstawionych w Publikacji 2 i miała na celu ocenę molekularną otrzymanych antygenowo-specyficznym limfocytów T regulatorowych. Mając na uwadze, iż komórki poliklonalne są z powodzeniem używane w terapii komórkowej, ich stabilność fenotypowa oraz molekularna zostały już potwierdzone. Chcąc wykorzystywać limfocyty antygenowo-specyficzne w leczeniu, również one muszą przejść wszystkie niezbędne badania. W związku z tym postanowiłam sprawdzić zachodzące zmiany epigenetyczne podczas procedury opisanej w Publikacji 2.

Do przeprowadzonego badania wybrano kilka genów (*Foxp3*, *Ctla-4*, *Ikzf-2*, *Ikzf-4*, *Tnfrsf18*, *Tet2* i *Runx1*), o których wiadomo, że są zaangażowane w funkcję Tregs i zbadano ich poziom ekspresji. Otrzymane wyniki pokazały, iż z wyjątkiem genu *Ikzf4*, Tregs wykazywały wyższą ekspresję badanych genów niż Teffs. Teffs specyficzne wobec insuliny jako jedyne wśród efektorów wykazywały niską, ale zauważalną ekspresję genów *Ikzf4*, *Tnfrsf18* i *Hmox1*. Wśród populacji Tregs, komórki specyficzne wobec peptydu 9-23 oraz poliklonalne były szczególnie interesujące, ponieważ wykazywały ekspresję wszystkich analizowanych genów. Tregs specyficzne wobec peptydu 9-23 odznaczały się najwyższym poziomem ekspresji genów *Runx1* i *Ikzf4*, jednakże ekspresja innych genów była umiarkowana. Z kolei Tregs specyficzne wobec insuliny charakteryzowały się najniższą ekspresji genów *Ikzf2*, *Foxp3*, *Ikzf4*, *Tet2* i *Runx1*.

W oparciu o test kolorymetryczny służący ilościowej ocenie ogólnej metylacji DNA zaobserwowano statystycznie istotne różnice między komórkami. Tregs specyficzne wobec insuliny i niespecyficzne wobec peptydu 9-23 miały najwyższy poziom metylacji. Tregs specyficzne wobec peptydu były znacznie mniej zmetylowane niż większość populacji, co wpływa na ich rozwój i wyższą stabilność funkcji supresyjnych.

Następnie zastosowano ilościową reakcję łańcuchową polimerazy specyficzną w celu wykrycia metylacji w regionie TSDR genu *Foxp3*. TSDR we wszystkich populacjach Tregs charakteryzował się poziomem demetylacji powyżej 75%. Wyniki te potwierdzono również z wykorzystaniem elektroforezy w żelu agarozowym. Tregs specyficzne wobec insuliny wykazały najniższy poziom demetylacji (75%), zaś limfocyty poliklonalne, których demetylacja wynosiła ~80%, były znacznie mniej demetylowane niż komórki stymulowane peptydem 9-23, które wykazały demetylację powyżej 90%.

Ostatnim wykonanym testem było określenie całkowitego stężenia białka histonu H3 i poszczególnych jego modyfikacji. Analizowałam modyfikacje aktywujące geny, takie jak metylacja: H3K4me(1-3), H3K9me1, H3K27me1, H3K36me(1-3), H3K79me(1-3); acetylacja: H3K9ac, H3K14ac, H3K18ac, H3K56ac; fosforylacja: H3ser28P, H3ser10P oraz modyfikacje inaktywujące geny, takie jak metylacja: H3K9me2, H3K9me3, H3K27me2, H3K27me3.

Porównanie udziału procentowego modyfikacji histonów H3 w całkowitym H3 między Treg i Teffs potwierdziło, że populacje Tregs wykazywały odwrotny wzór modyfikacji. Podczas badania różnic między populacjami Tregs, komórki poliklonalne wykazywały najwyższy poziom modyfikacji histonów. Zaobserwowano również, że Tregs specyficzne wobec insuliny wykazywały niższy poziom modyfikacji niż Tregs specyficzne wobec peptydu 9-23, z wyjątkiem H3K18ac, H3K9me1, H3K9me3 i H3K36me2.

*Publikacja została **nagrodzona** „Nagrodą Specjalną Rektora Gdańskiego Uniwersytetu medycznego” w 2021 roku.*

Podsumowanie osiągnięcia habilitacyjnego

Tematem przedstawionego cyklu habilitacyjnego jest „Udoskonalanie terapii komórkowej limfocytami T regulatorowymi w chorobach autoimmunologicznych”. W tym celu postanowiłam sprawdzić czy poliklonalne limfocyty T regulatorowe mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu stwardnienia rozsianego. Dodatkowo oceniłam, czy preparat komórkowy działa efektywniej po podaniu dożylnym, jak to ma miejsce w leczeniu cukrzycy typu 1 u dzieci, czy po administracji dokanałowej. Jednocześnie, opracowałam metodę otrzymywania limfocytów T regulatorowych specyficznych wobec konkretnych antygenów, których działanie miałyby charakter lokalny, nie zaś ogólnoustrojowy, jak to ma miejsce w leczeniu cukrzycy typu 1 limfocytami poliklonalnymi, oraz potwierdziłam ich stabilność fenotypową. Moim zdaniem opracowanie bezpiecznej, prostej i opłacalnej ekonomicznie metody otrzymywania komórek o wybranej specyficzności antygenowej i wysokim potencjale supresorowym jest interesującą drogą dla przyszłych badań klinicznych z wykorzystaniem limfocytów T regulatorowych jako narzędzia terapeutycznego.

Pierwszy cel, którym było zbadanie bezpieczeństwa preparatu w leczeniu stwardnienia rozsianego, jak również określenie czy na efektywność działania preparatu ma wpływ miejsce jego administracji został osiągnięty (Publikacja 1). Potwierdzono, że zarówno dożylnie,

jak i dokanałowe podanie preparatu Tregs jest bezpieczną formą leczenia pacjentów ze SM, co pozwala na przejście do kolejnego etapu rozwoju terapii. Jednocześnie skany MRI pokazały, że pacjenci leczeni dokanałowo wykazywali wolniejszy progres choroby. Wyniki sugerują zatem, że administracja dokanałowa powinna być przedmiotem przyszłych badań. Niemniej jednak, wnioski te muszą zostać potwierdzone na większej ilości pacjentów w trakcie badań II fazy, które jest obecnie przez nas przygotowywane.

Kolejne cele, którymi były opracowanie metody *in vitro* generowania modelowych, antygenowo-specyficznych limfocytów T regulatorowych do użytku klinicznego oraz ocenienie efektywności ich działania, zostały przedstawione w Publikacji 2. Komórki te mogłyby znaleźć zastosowanie w leczeniu chorób autoimmunologicznych oraz w hamowaniu niepożądanych reakcji immunologicznych, takich jak odrzucenie przeszczepu, alergii czy GvHD. Obecnie stosowane w klinice są Tregs poliklonalne, co oznacza, że rozpoznają one wiele różnych antygenów, a zatem ich skuteczność może być osłabiona^{2,3,27,30,32,33,43,47,48}.

Przedstawiona publikacja zawiera schemat umożliwiający selekcję komórek reagujących na zdefiniowany antygen, dzięki czemu mogą przemieszczać się do tkanek ekspresujących określone antygeny i hamować autoreaktywne limfocyty odpowiedzialne za odpowiedź zapalną przeciwko określonym antygenom - nie ogólnoustrojowo, ale lokalnie. Zastosowanie Tregs reagujących z antygenem pozwoli na bardziej precyzyjne leczenie i zmniejszenie dawki preparatu komórkowego oraz potencjalnie zwiększy skuteczność leczenia jednocześnie zmniejszając możliwe skutki uboczne.

Otrzymane wyniki wskazują na hamującą aktywność produktu komórkowego. Produkt antygenowo-specyficzny nie był jednorodny pod względem klonalności, jednakże znacząco różnił się pod tym kątem od preparatu poliklonalnego oraz niespecyficznego. Badania pokazały również różną siłę aktywacji Tregs, w zależności od użytego antygeny, co podkreśla ogromne znaczenie, a także trudność w doborze odpowiedniego antygeny by otrzymać jak najlepszą stymulację komórek o jak najlepszym potencjale terapeutycznym.

Ostatni cel, czyli ocena molekularna otrzymanych komórek oraz potwierdzenie ich stabilności, został przedstawiony w Publikacji 3. Nasze wyniki wyraźnie pokazują, że stymulacja monocytami prezentującymi antygeny całej insuliny lub peptydem 9-23 łańcucha β insuliny powoduje zmiany epigenetyczne w limfocytach T regulatorowych oraz że rodzaj stymulacji determinuje poziom zmian w globalnym wzorcu metylacji DNA, swoistej metylacji regionu TSDR oraz modyfikacji histonów H3 PTM. Peptyd 9-23 łańcucha β insuliny promuje głównie zmiany zorientowane na Tregs, podczas gdy fenotyp po stymulacji insuliną był mniej

wyraźny. Dodatkowo, komórki specyficzne wobec peptydu 9-23 charakteryzowały się wysoką ekspresją kluczowych genów oraz najwyższym poziomem demetylacji, co wpływa na ich lepsze właściwości supresorowe.

Wzór zmian epigenetycznych może pomóc w znalezieniu peptydów, które w przyszłych lekach komórkowych kształtowałyby wyłącznie odpowiedź supresyjną, w której pośredniczą Tregs, lub odpowiedź zapalną, w której pośredniczą T_H17. Nasze obserwacje wskazują, że Tregs specyficzne dla antygeny podczas hodowli komórkowej pozostały stabilne i obejmują wszystkie cechy związane z funkcją. Utwierdza nas to w przekonaniu, że protokół pozwalający na uzyskanie antygenowo specyficznych limfocytów T regulatorowych jest obiecującą strategią terapii komórkowej, m.in. w cukrzycy typu 1.

Bibliografia

1. Chen X, Du Y, Lin X, Qian Y, Zhou T, Huang Z. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in tumor immunity. *Int Immunopharmacol*. 2016;34:244–9.
2. Trzonkowski P, Dukat-Mazurek A, Bieniaszewska M, Marek-Trzonkowska N, Dobyszuk A, Juścińska J, et al. Treatment of graft-versus-host disease with naturally occurring T regulatory cells. *BioDrugs*. 2013;27(6):605–14.
3. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(7):523–32. doi:10.1038/nri2343.
4. Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*. 1970;18:723–37.
5. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995;155(3):1151–64.
6. Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, et al. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet*. 2001;27(1):18–20.
7. Edinger M. Regulatory T cells for the prevention of graft-versus host disease: professionals defeat amateurs. *Eur J Immunol*. 2009;39(11):2966–8.
8. Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, Drago K, Fathman CG, Strober S, et al. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells preserve graft versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med*. 2003;9(9):1144–50.
9. Tang Q, Lee K. Regulatory T-cell therapy for transplantation: how many cells do we need? *Curr Opin Organ Transpl*. 2012;17:349–54.

10. Trenado A, Sudres M, Tang Q, Maury S, Charlotte F, Grégoire S, et al. Ex vivo-expanded CD4+CD25+ immunoregulatory T cells prevent graft-versus-host-disease by inhibiting activation/differentiation of pathogenic T cells. *J Immunol.* 2006;176(2):1266–73.
11. Duran-Struuck R, Sondermeijer HP, Bühler L, Alonso-Guallart P, Zitsman J, Kato Y, et al. Effect of ex vivo-expanded recipient regulatory T cells on hematopoietic chimerism and kidney allograft tolerance across MHC barriers in cynomolgus macaques. *Transplantation.* 2017;101(2):274–83.
12. Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, Wood KJ. CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol.* 2002;168(3):1080–6.
13. Karim M, Feng G, Wood KJ, Bushell AR. CD25+CD4+ regulatory T cells generated by exposure to a model protein antigen prevent allograft rejection: antigen-specific reactivation in vivo is critical for bystander regulation. *Blood.* 2005;105(12):4871–7.
14. Bendelac A, Carnaud C, Boitard C, Bach JF. Syngeneic transfer of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to healthy neonates. Requirement for both L3T4+ and Lyt-2+ T cells. *J Exp Med.* 1987;166(4):823–32.
15. Tritt M, Sgouroudis E, D’Hennezel E, Albanese A, Piccirillo CA. Functional waning of naturally occurring CD4+ regulatory T-cells contributes to the onset of autoimmune diabetes. *Diabetes.* 2008;57:113–23.
16. Tonkin DR, Haskins K. Regulatory T cells enter the pancreas during suppression of type 1 diabetes and inhibit effector T cells and macrophages in a TGF-beta-dependent manner. *Eur J Immunol.* 2009;39(5):1313–22.
17. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med.* 2004;199(7):971–9.
18. Elong Ngonu A, Pettre’ S, Salou M, Bahbouhi B, Soulillou JP, Brouard S, et al. Frequency of circulating autoreactive T cells committed to myelin determinants in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Clin Immunol.* 2012;144(2):117–26.
19. Jee Y, Piao WH, Liu R, Bai XF, Rhodes S, Rodebaugh R, et al. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells contribute to the therapeutic effects of glatiramer acetate in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Immunol.* 2007;125(1):34–42.
20. Kohm AP, Carpentier PA, Anger HA, Miller SD. Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2002;169(9):4712–6.
21. Ono M, Shimizu J, Miyachi Y, Sakaguchi S. Control of autoimmune myocarditis and multiorgan inflammation by glucocorticoid- induced TNF receptor family-related protein(high), Foxp3-expressing CD25+ and CD25- regulatory T cells. *J Immunol.* 2006;176(8):4748–56.

22. Juvet SC, Whatcott AG, Bushell AR, Wood KJ. Harnessing regulatory T cells for clinical use in transplantation: the end of the beginning. *Am J Transplant*. 2014;14(4):750–63.
23. St Clair EW, Turka LA, Saxon A, Matthews JB, Sayegh MH, Eisenbarth GS, et al. New reagents on the horizon for immune tolerance. *Annu Rev Med*. 2007;58:329–46.
24. Ford ML, Adams AB, Pearson TC. Targeting co-stimulatory pathways: transplantation and autoimmunity. *Nat Rev Nephrol*. 2014. doi:10.1038/nrneph.2013.183.
25. Durrbach A, Pestana JM, Florman S, Del Carmen RM, Rostaing L, Kuypers D, et al. Long-term outcomes in Belatacept- versus cyclosporine-treated recipients of extended criteria donor kidneys: final results from BENEFIT-EXT, a phase III randomized study. *Am J Transplant*. 2016;16(11):3192–201.
26. Orban T, Bundy B, Becker DJ, Di Meglio LA, Gitelman SE, Goland R, Type 1 Diabetes Trial Net Abatacept Study Group, et al. Co-stimulation modulation with abatacept in patients with recent-onset type 1 diabetes: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2011;378(9789):412–9.
27. Trzonkowski P, Bieniaszewska M, Juścińska J, Dobyszuk A, Krzystyniak A, Marek N, Myśliwska J, Hellmann A. First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4+CD25+CD127- T regulatory cells. *Clin Immunol*. 2009a;133:22–6.
28. Wang XJ, Leveson-Gower D, Golab K, Wang LJ, Marek-Trzonkowska N, Krzystyniak A, et al. Influence of pharmacological immunomodulatory agents on CD4(+)CD25(high)FoxP3(+) T regulatory cells in humans. *Int Immunopharmacol*. 2013;16(3):364–70.
29. Trzonkowski P, Bacchetta R, Battaglia M, Berglund D, Bohnenkamp HR, ten Brinke A, Bushell A, Cools N, Geissler EK, Gregori S, Marieke van Ham S, Hilkens C, Hutchinson JA, Lombardi G, Madrigal JA, Marek-Trzonkowska N, Martinez-Caceres EM, Roncarolo MG, Sanchez-Ramon S, Saudemont A, Sawitzki B. Hurdles in therapy with regulatory T cells. *Sci Transl Med* 2015;7(304). 304ps18.
30. Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A, Terenzi A, Castellino F, Bonifacio E, Del Papa B, Zei T, Ostini RI, Cecchini D, Aloisi T, Perruccio K, Ruggeri L, Balucani C, Pierini A, Sportoletti P, Aristei C, Falini B, Reisner Y, Velardi A, Aversa F, Martelli MF. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood* 2011;117(14):3921–8.
31. Gliwiński M, Iwaszkiewicz-Grzes D, Trzonkowski P. Cell-Based Therapies With T Regulatory Cells. *BioDrugs* 2017;31(4):335–47.
32. Trzonkowski P, Szaryńska M, Myśliwska J, Myśliwski A. Ex vivo expansion of CD4(+)CD25(+) T regulatory cells for immunosuppressive therapy. *Cytometry A*. 2009;75(3):175–88. doi:10.1002/cyto.a.20659.
33. Marek-Trzonkowska N, Mysliwiec M, Dobyszuk A, Grabowska M, Techmanska I, Juscinska J, Wujtewicz MA, Witkowski P, Mlynarski W, Balcerska A, Mysliwska J, Trzonkowski P. Administration of CD4+CD25highCD127- regulatory T cells preserves b-cell function in type 1 diabetes in children. *Diabetes Care* 2012;35 (9):1817–20.

34. Marek-Trzonkowska N, Myśliwec M, Siebert J, Trzonkowski P. Clinical application of regulatory T cells in type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes* 2013;14(5):322–32.
35. Raddassi K, Kent SC, Yang J, Bourcier K, Bradshaw EM, Seyfert-Margolis V, Nepom GT, Kwok WW, Hafler DA. Increased frequencies of myelin oligodendrocyte glycoprotein/MHC class II-binding CD4 cells in patients with multiple sclerosis. *J Immunol*. 2011;187:1039.
37. Haas J, Hug A, Viehöver A, Fritzsching B, Falk CS, Filser A, Vetter T, Milkova L, Korporal M, Fritz B, Storch-Hagenlocher B, Krammer PH, Suri-Payer E, Wildemann B. Reduced suppressive effect of CD4+CD25high regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol*. 2005;35:3343–52.
36. Nylander A, Hafler DA. Multiple sclerosis. *J Clin Investig*. 2012;122:1180–8.
38. Venken K, Hellings N, Hensen K, Rummens JL, Medaer R, Dhooghe MB, Dubois B, Raus J, Stinissen P. Secondary progressive in contrast to relapsing-remitting multiple sclerosis patients show a normal CD4+CD25+ regulatory T-cell function and FOXP3 expression. *J Neurosci Res*. 2006;83:1432–46.
39. Feger U, Luther C, Poeschel S, Melms A, Tolosa E, Wiendl H. Increased frequency of CD4+ CD25+ regulatory T cells in the cerebrospinal fluid but not in the blood of multiple sclerosis patients. *Clin Exp Immunol*. 2007;147:412–8.
40. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2001;50:121–7.
42. European Medicinal Agency (2005) Guideline on clinical trials in small populations. CHMP/EWP/83561/2005s. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-clinical-trials-small-populations_en.pdf. Accessed 26 Aug 2021
41. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Lublin FD, Montalban X, O'Connor P, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Waubant E, Weinshenker B, Wolinsky JS. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*. 2011;69:292–302.
43. Marek-Trzonkowska N, Myśliwec M, Dobyszuk A, Grabowska M, Derkowska I, Juścińska J, Owczuk R, Szadkowska A, Witkowski P, Młynarski W, Jarosz-Chobot P, Bossowski A, Siebert J, Trzonkowski P. Therapy of type 1 diabetes with CD4+CD25highCD127-regulatory T cells prolongs survival of pancreatic islets—results of one year follow-up. *Clin Immunol*. 2014;153:23–30.
44. Marek-Trzonkowska N, Myśliwec M, Iwaszkiewicz-Grześ D, Gliwiński M, Derkowska I, Żalińska M, Zieliński M, Grabowska M, Zielińska H, Piekarska K, Jaźwińska-Curyło A, Owczuk R, Szadkowska A, Wyka K, Witkowski P, Młynarski W, Jarosz-Chobot P,

- Bossowski A, Siebert J, Trzonkowski P. Factors affecting long-term efficacy of T regulatory cell-based therapy in type 1 diabetes. *J Transl Med.* 2016;14:332.
45. Marek N, Bieniaszewska M, Krzystyniak A, Juscinska J, Mysliwska J, Witkowski P, Hellmann A, Trzonkowski P. The time is crucial for ex vivo expansion of T regulatory cells for therapy. *Cell Transplant.* 2011;11–12:1747–58.
46. Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y, Shevach EM. Expression of helios, an ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol.* 2010;184:3433–8.
47. Bluestone JA, Trotta E, Xu D. The therapeutic potential of regulatory T cells for the treatment of autoimmune disease. *Expert Opin Ther Targets* 2015;19(8):1091–103.
48. Stelmaszczyk-Emmel A. Regulatory T cells in children with allergy and asthma: it is time to act. *Respir Physiol Neurobiol.* 2015;209:59-63.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

5.1. Analiza bibliometryczna dorobku naukowego na dzień 26.10.2021

Sumaryczny Impact Factor:

- całego dorobku naukowego: 77,154
- po uzyskaniu stopnia doktora (bez osiągnięcia habilitacyjnego): 54,940
- osiągnięcia habilitacyjnego: 18,782
- pozostały dorobek (przed uzyskaniem stopnia doktora): 3,432

Łączna suma punktów MEiN:

- całego dorobku naukowego: 1194
- po uzyskaniu stopnia doktora: 805
- osiągnięcia habilitacyjnego: 340
- pozostały dorobek: 49

Łączna liczba doniesień konferencyjnych: 26

Liczba patentów: 3

Liczba cytowań według na dzień 26.10.2021:

Web of Science: **218** (bez autocytowań 187)

Scopus: **225** (bez autocytowań wszystkich współautorów 194)

Index Hirscha według:

Web of Science: **8**

Scopus: **8**

5.2. Lista publikacji nie wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Osiągnięcia naukowe po uzyskaniu stopnia doktora

Pomimo zmiany moich głównych zainteresowań na choroby autoimmunologiczne, nadal kontynuuję współpracę z Katedrą Chemii Organicznej Politechniki Gdańskiej. Początkowo skupiałam się na pochodnych akrydynowych i akrydonowych kwasu mykofenolowego (MPA) (Publikacja 11), badając ich aktywność biologiczną na liniach komórkowych oraz krwi obwodowej zdrowych dawców Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Gdańsku. Dodatkowo powstała praca przeglądowa zawierająca sposoby syntezy inhibitorów dehydrogenazy inozyno 5'-monofosforanowej (IMPDH) (Publikacja 12).

Zwarzywszy na fakt, że MPA oraz jego pochodne wpływają na hamowanie proliferacji limfocytów T, postanowiliśmy sprawdzić ich aktywność wobec komórek dendrytycznych, jako komórek prezentujących antygen. Otrzymane wyniki (Publikacja 9) pozwoliły na selekcję kilku związków, które będziemy chcieli przebadać na zwierzętach w przyszłości.

Od momentu rozpoczęcia realizacji kierowanego przeze mnie projektu LIDER, skrupulatnie poszerzam swoją wiedzę w zakresie chorób autoimmunologicznych, zwłaszcza cukrzycy typu 1 (T1D) oraz stwardnienia rozsianego (SM). Swoje badania rozpoczęłam od zbadania czynników wpływających na długoterminową skuteczność terapii opartej na komórkach T regulatorowych (Tregs) w T1D, gdzie do moich zadań należała analiza działania IL2, na zachowanie zdolności proliferacyjnych i supresorowych przez limfocyty Treg (Publikacja 10). Jednocześnie postanowiliśmy opracować sposób monitorowania odpowiedzi komórek T w badaniach translacyjnych, poprzez harmonizację testów do oceny odpowiedzi specyficznych dla antygeny (Publikacja 7). Następnie uczestniczyłam w pisaniu prac przeglądowych, dotyczących terapii komórkowych (Publikacja 8) oraz niebezpieczeństwa indukcji nowotworów podczas wykorzystywania Tregs w leczeniu (Publikacja 5). Wiedząc, jak wiele trudności sprawia odpowiednie przedstawienie procedury otrzymywania i hodowli Tregs, współpracując z wieloma ośrodkami na świecie, postanowiliśmy stworzyć zbiór wytycznych przedstawiania wyników produkcji limfocytów T regulatorowych (Publikacja 6).

We współpracy z Uniwersytetem w Amsterdamie udało nam się również opracować nowy marker, GPA33, służący do identyfikacji stabilnych limfocytów T regulatorowych (Publikacja 4).

W między czasie podjęłam również próbę modyfikacji limfocytów Treg w celu otrzymania komórek antygenowo-specyficznych mogących w przyszłości znaleźć zastosowanie w terapiach komórkowych. Badania te pozwoliły mi również na poszerzenie wiedzy z zakresu biologii molekularnej, zwłaszcza ekspresji genów, metylacji genomowego DNA, modyfikacji histonów, czy innych (Publikacje cyklu habilitacyjnego oraz 1).

Poszerzając również swoją wiedzę z zakresu stwardnienia rozsianego, brałam udział w powstaniu publikacji przeglądowej, zawierającej informacje odnośnie obecnych sposobów leczenia SM, m.in. terapie komórkowe (Publikacja 2), jak również w badaniu czy limfocyty T regulatorowe mogłyby znaleźć zastosowanie w leczeniu tejże choroby oraz czy sposób ich administracji ma wpływ na powodzenie terapii (Publikacja z cyklu habilitacyjnego oraz 2).

		IF	MEiN	Liczba cytowań
1	Piotrowska M., Gliwinski M., Trzonkowski P., Iwaszkiewicz-Grzes D. ✉, „Regulatory T cells-related genes are under DNA methylation influence”, International Journal of Molecular Sciences , 2021	5,923	140	0
2	Maria Jose Mansilla, Silvia Presas-Rodríguez, Aina Teniente-Serra, Íñigo González-Larreategui, Bibiana Quirant-Sánchez, Federico Fondelli, Neda Djedovic, Iwaszkiewicz-Grześ D. , Kamil Chwojncki, Djordje Miljković, Piotr Trzonkowski, Cristina Ramo-Tello, EM Martínez-Cáceres, „Paving the way for an effective treatment for patients with Multiple Sclerosis. <i>Advances in cell therapy</i> ”, Cell Mol Immunol. , 2021, 18(6):1353-1374.	11,53	140	1
3	Gliwiński M#, Iwaszkiewicz-Grześ D.# , Wołoszyn-Durkiewicz A, Tarnowska M, Żalińska M, Hennig M, Zielińska H, Dukat-Mazurek A, Zielkowska-Dębska J, Zieliński M, Jaźwińska-Curyło A, Owczuk R, Jarosz-Chobot P, Bossowski A, Szadkowska A, Młynarski W, Marek-Trzonkowska N, Moszkowska G, Siebert J, Myśliwiec M, Trzonkowski P., „Proinsulin-specific T regulatory cells may control immune responses in type 1 diabetes: implications for adoptive therapy”, BMJ Open Diabetes Res Care , 2020, 8(1), pii: e000873.	3,388	100	4

4	Opstelten R., De Kivit S., Slot M., Van den Biggelaar M., Iwaszkiewicz-Grześ D. , Gliwinski M., Scott A.M, Blom B., Trzonkowski P., Borst J., Cuadrado E., Amsen D., “ <i>GPA33: a marker to identify stable human regulatory T cells</i> ”, J. Immunol. , 2020 , 204(12), 3139-3148	5,422	140	8
5	Gliwinski M.#, Piotrowska M.#, Iwaszkiewicz-Grzes D. , Urban-Wojciuk Z., Trzonkowski P., „ <i>Therapy with CD4(+)CD25(+) T regulatory cells - should we be afraid of cancer?</i> ”, Contemp Oncol. , 2019 , 23(1), 1-6.	0	70	6
6	Fuchs A., Gliwinski M., Grageda N., Spiering R., Abbas A.K., Appel S., Berglund D., Blazar B., Bluestone J., Ten Brinke A., Brusko T.M., Cuturi M.C., Geissler E., Giannoukakis N., Golab K., Hafler D.A., Hester J., Hippen K., Di Ianni M., Ilic N., Isaacs J., Issa F., Iwaszkiewicz-Grzes D. et al. , “ <i>Minimum Information about T Regulatory Cells: A Step toward Reproducibility and Standardization</i> ”, Frontiers in Immunology , section Immunological Tolerance and Regulation, 2018 , 8,1844.	4,716	35	25
7	Ten Brinke A., Marek-Trzonkowska N.M., Mansilla M.J., Turksma A., Piekarska K., Iwaszkiewicz-Grzes D. , Passerini L., Locafaro G., Puñet-Ortiz J., Van Ham S.M., Hernandez-Fuentes M.P., Martinez-Caceres E., Gregori S., “ <i>Monitoring T cell responses in translational studies: assay harmonization for evaluation of antigen-specific responses</i> ”, Frontiers in Immunology , section Immunological Tolerance and Regulation, 2017 , 8, 1870.	5,511	35	15
8	Gliwiński M., Iwaszkiewicz-Grześ D. , Trzonkowski P., „ <i>Cell-Based Therapies with T Regulatory Cells</i> ”, BioDrugs , 2017 , 31(4), 335-347.	3,825	25	44
9	Iwaszkiewicz-Grześ D. , Cholewiński G., Kot-Wasik A., Trzonkowski P., Dzierzbicka K., „ <i>Investigations on the immunosuppressive activity of derivatives of mycophenolic acid in immature dendritic cells</i> ”, Int Immunopharmacol , 2017 , 44, 137-142.	3,118	30	5
10	Marek-Trzonkowska N., Myśliwiec M., Iwaszkiewicz-Grześ D. , Gliwiński M., Derkowska I., Żalińska M., Zieliński M., Grabowska M., Zielińska H., Piekarska K., Jaźwińska-Curyłło A., Owczuk R., Szadkowska A., Wyka K., Witkowski P., Młynarski W., Jarosz-Chobot P., Bossowski A., Siebert J., Trzonkowski P. ” <i>Factors affecting long-term efficacy of T regulatory cell-based therapy in type 1 diabetes</i> ”, J Transl Med. 2016 ;14(1):332.	3,786	35	49

11	Cholewiński G., Iwaszkiewicz-Grześ D. , Trzonkowski P., Dzierzbicka K., <i>Synthesis and antiproliferative activity of ester conjugates of mycophenolic acid and acridines/acridones</i> , J Enzyme Inhib Med Chem , 2016, 31(6), 974-982.	4,293	25	9
12	Cholewiński G., Iwaszkiewicz-Grześ D. , Prejs M., Głowacka A., Dzierzbicka K., <i>Synthesis of the inosine 5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) inhibitors</i> , J Enzyme Inhib Med Chem , 2015, 30(4), 550-563.	3,428	20	12
	Ogółem	54,940	795	173

autor równorzędny

☒ autor korespondencyjny

Osiągnięcia naukowe przed uzyskaniem stopnia doktora

Swoją pracę naukową, która w rezultacie doprowadziła do otrzymania stopnia doktora nauk chemicznych, rozpoczęłam od otrzymywania pochodnych kwasu mykofenolowego. Kwas mykofenolowy (MPA), jak również jego pochodne, MMF oraz MPS, wykorzystywane są z powodzeniem jako leki immunosupresyjne po przeszczepie serca, nerek lub wątroby. Niekiedy, MPA znajduje również zastosowanie w leczeniu chorób autoimmunologicznych.

W trakcie prowadzonych badań skupiałam się nad otrzymaniem aminokwasowych pochodnych MPA oraz badaniu ich aktywności biologicznej, z wykorzystaniem linii komórkowych Jurkat, MOLT-4 oraz krwi obwodowej zdrowych dawców Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Gdańsku. Badania te pozwoliły na opublikowanie pracy "Synthesis and biological activity of mycophenolic acid-amino acid derivatives" i potwierdziły hipotezę, iż utworzenie wiązania amidowego oraz dołączenie odpowiednich grup aminokwasowych zwiększa właściwości immunosupresyjne MPA, a co najważniejsze, związki te charakteryzowały się niższą cytotoksycznością niż związek natywny. W trakcie prac eksperymentalnych powstała również praca przeglądowa opisująca znane leki immunosupresyjne, a także nowe związki o potencjalnym zastosowaniu klinicznym, uwzględniając mechanizm ich działania oraz metody otrzymywania.

Powyższe wyniki zostały również opatentowane w 2016 roku.

		IF	MEiN	Liczba cytowań
1	Iwaszkiewicz-Grześ D., Cholewiński G., Kot-Wasik A., Dzierzbicka K., Trzonkowski P., <i>Synthesis and biological activity of mycophenolic acid-amino acid derivatives</i> , Eur. J. Med. Chem. , 2013, 69, 863.	3,432	40	28
2	Dzierzbicka K., Cholewiński G., Iwaszkiewicz-Grześ D., Trzonkowski P., <i>Poszukiwanie nowych leków immunosupresyjnych (Quest for new immunosuppressive drugs)</i> , Wiad. Chem. , 2011, 65, 59.	0	9	0
	Ogółem	3,432	49	28

5.3. Lista patentów

		Data zgłoszenia	Data przyznania
1	D. Iwaszkiewicz-Grześ, M. Gliwiński, P. Trzonkowski „Sposób otrzymywania <i>in vitro</i> antygenowo specyficznych limfocytów T regulatorowych” WIPO ST 10/C PL430932 WO2021034208	22.08.2019	21.05.2021
2	G. Cholewinski, K. Dzierzbicka, D. Iwaszkiewicz-Grześ, P. Trzonkowski „Estrowe koniugaty kwasu mykofenolowego i pochodnych akrydonów, estrowe koniugaty kwasu mykofenolowego i pochodnych akrydyn, sposób ich otrzymywania oraz zastosowanie jako immunosupresanty, zwłaszcza do stosowania w zapobieganiu odrzucaniu przeszczepów” P.407332	27.02.2014	21.05.2020
3	G. Cholewinski, K. Dzierzbicka, D. Iwaszkiewicz-Grześ, P. Trzonkowski „Nowe amidowe pochodne kwasu mykofenolowego, sposób otrzymywania amidowych pochodnych kwasu mykofenolowego, i zastosowanie nowych pochodnych kwasu mykofenolowego do wytwarzania leku immunosupresyjnego zwłaszcza zmniejszającego ryzyko odrzucenia przeszczepów” [P.402374] PL 221807 B1	07.01.2013	31.05.2016

5.4. Lista rozdziałów w książkach

- **Chapter 1:** “Novel Experimental Therapies of Type 1 Diabetes and Future Perspectives” Alterations in Glucose Homeostasis in Children, Chapter: Chapter 4, Publisher: Nova Science Publishers, Inc., Editors: E. Otto-Buczowska, January 2015, MEiN=5
- **Chapter 4:** “Pathogenesis of Autoimmune Type 1 Diabetes” Alterations in Glucose Homeostasis in Children, Chapter: Chapter 4, Publisher: Nova Science Publishers, Inc., Editors: E. Otto-Buczowska, January 2015, MEiN=5

6. **Udział w projektach badawczych**

- a) **Tytuł projektu:** Dynamika zmian na poziomie molekularnym w komórkach układu odpornościowego stymulowanych monocytami

Okres realizacji: 2021-2022

Nazwa organu przyznającego fundusze: Gdański Uniwersytet Medyczny

Nr projektu: MTN/664/272/61/71-1216

Pełniona funkcja: **Kierownik projektu**

Projekt jest w trakcie realizacji i ma na celu analizę dynamiki zmian limfocytów T regulatorowych stymulowanych wybranymi antygenami otrzymanych zgodnie z protokołem opisanym w Publikacji 2 cyklu habilitacyjnego.

- b) **Tytuł projektu:** TREG – innovative cell therapy targeting Diabetes Type 1 — TREG’ (TREG – terapia komórkowa cukrzycy typu 1)

Okres realizacji: 2018-2022

Nazwa organu przyznającego fundusze: Horyzont2020 (Mechanizm SME), wspieranie innowacyjnych MŚP w sektorze biotechnologii medycznej

Pełniona funkcja: **Wykonawca**

Projekt jest w trakcie realizacji i służy przygotowaniu rejestracyjnych badań klinicznych preparatu limfocytów T regulatorowych w Europejskiej Agencji Leków.

c) **Tytuł projektu:** Ocena antygenowo specyficznych limfocytów regulatorowych u dzieci ze świeżo rozpoznaną cukrzycą typu 1

Okres realizacji: 2016-2019

Nazwa organu przyznającego fundusze: Narodowe Centrum Badań i Rozwoju

Nr projektu: LIDER/160/L-6/14/NCBiR/2015

Pełniona funkcja: **Kierownik projektu**

Efektom projektu jest patent „Sposób otrzymywania in vitro antygenowo specyficznych limfocytów T regulatorowych” przyznany w 2021 roku, liczne publikacje oraz wystąpienia konferencyjne:

- „Antigenic challenge influences epigenetic changes in antigen-specific T regulatory cells” – publikacja z cyklu habilitacyjnego
- „Regulatory T cells-related genes are under DNA methylation influence” – publikacja z cyklu habilitacyjnego
- „Antigen-reactive regulatory T cells can be expanded in vitro with monocytes and anti-CD28 and anti-CD154 antibodies”
- „Proinsulin-specific T regulatory cells may control immune responses in type 1 diabetes: implications for adoptive therapy”
- „Monitoring T cell responses in translational studies: assay harmonization for evaluation of antigen-specific responses”

Projekt umożliwił zarówno mi, jak i doktorantowi mgr Mateuszowi Gliwińskiemu, u którego byłam promotorem pomocniczym, odbycie szkolenia „Wymogi higieny i standardy pracy w pomieszczeniach clean room zgodnie z normami PN-EN ISO14644 oraz GMP”.

W trakcie realizacji projektu podjęliśmy współpracę z wieloma ośrodkami zagranicznymi, m.in. z Politechniką w Dreźnie, Uniwersytetem w Barcelonie, Uniwersytetem w Belgradzie i innymi.

d) **Tytuł projektu:** Terapia komórkowa w oparciu o namnożone sztucznie limfocyty regulatorowe CD4+CD25+CD127-

Okres realizacji: 2014-2017

Nazwa organu przyznającego fundusze: Narodowe Centrum Badań i Rozwoju

Nr projektu: STRATEGMED1/233368/1/NCBR/2014

Pełniona funkcja: **Koordynator zadania 4 oraz wykonawca przez cały okres trwania projektu**

Projekt ten skupiał się na badaniu klinicznym fazy I/II bezpieczeństwa i skuteczności preparatu limfocytów T regulatorowych w cukrzycy typu 1 u dzieci oraz stwardnienia rozsianego u dorosłych.

Efektami projektu są liczne publikacje oraz wystąpienia konferencyjne:

- „Administration of CD4+CD25highCD127-foxp3+ regulatory T cells for relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase I study” – publikacja z cyklu habilitacyjnego
- „Combined Immunotherapy with T Regulatory Cells and Anti-CD20 Antibody Prolongs Survival of Pancreatic Islets in Type 1 Diabetes” – w druku
- „Factors affecting long-term efficacy of T regulatory cell-based therapy in type 1 diabetes”

- e) **Tytuł projektu:** Produkcja przemysłowa limfocytów TREGS jako produktu terapii zaawansowanej przy użyciu bioreaktora

Okres realizacji: 2016-2019

Nazwa organu przyznającego fundusze: Narodowe Centrum Badań i Rozwoju

Nr projektu: POIR.01.01.01-00-0769/15-03

Pełniona funkcja: **Wykonawca**

Celem projektu było opracowanie technologii leczenia limfocytami T regulatorowymi oferowanej przez Uniwersyteckie Centrum Kliniczne w formie wyjątku szpitalnego.

- f) **Tytuł projektu:** Synteza i badania aktywności biologicznej nowych analogów kwasu mykofenolowego

Okres realizacji: 2011-2014

Nazwa organu przyznającego fundusze: Narodowe Centrum Badań i Rozwoju

Nr projektu: LIDER/07/58/L-2/10/NCBiR/2011

Pełniona funkcja: **Główny wykonawca**

Celem projektu była synteza pochodnych kwasu mykofenolowego jako potencjalnego leku immunosupresyjnego. W wyniku realizacji projektu powstała rozprawa doktorska mojego

autorstwa „Synteza i badania biologiczne nowych aminokwasowych analogów kwasu mykofenolowego”, dwa patenty „Nowe amidowe pochodne kwasu mykofenolowego, sposób otrzymywania amidowych pochodnych kwasu mykofenolowego, i zastosowanie nowych pochodnych kwasu mykofenolowego do wytwarzania leku immunosupresyjnego zwłaszcza zmniejszającego ryzyko odrzucenia przeszczepów” otrzymany 2016 roku oraz „Estrowe koniugaty kwasu mykofenolowego i pochodnych akrydonów, estrowe koniugaty kwasu mykofenolowego i pochodnych akrydyn, sposób ich otrzymywania oraz zastosowanie jako immunosupresanty, zwłaszcza do stosowania w zapobieganiu odrzuceniu przeszczepów” otrzymany 2020 roku. Dodatkowo powstały liczne publikacje oraz doniesienia konferencyjne.

7. Uczestnictwo w programach europejskich

- BM1305: Action to Focus and Accelerate Cell based Tolerance-inducing Therapies (A FACTT)

Organizowane spotkania umożliwiły wymianę doświadczeń, rozwiązywanie ewentualnych problemów oraz nawiązywanie współpracy międzyośrodkowej.

Wynikiem współpracy nawiązanej w trakcie trwania programu była m.in. publikacja „Minimum Information about T Regulatory Cells: A Step toward Reproducibility and Standardization”, stanowiąca zbiór wytycznych przedstawiania wyników produkcji limfocytów T regulatorowych. W trakcie jej realizacji nawiązaliśmy współpracę z wieloma ośrodkami na świecie, zrzeszając wszystkich kluczowych naukowców zajmujących się komórkami Tregs.

8. Udział w konferencjach naukowych

Łączna liczba doniesień zjazdowych: 26 (po uzyskaniu stopnia doktora: 16)

- Konferencje o randze międzynarodowej: **23**
- Konferencje o randze krajowej: **3**

Szczegółowe dane bibliograficzne streszczeń zjazdowych ujęto w Załączniku.

9. Nagrody, nominacje i wyróżnienia

- **Nagroda Specjalna Rektora GUMed** za publikację „*Regulatory T Cells-Related Genes Are under DNA Methylation Influence*” - **2021**
- **Nagroda Specjalna Rektora GUMed** za publikację „*Administration of CD4+CD25high CD127-FoxP3+ Regulatory T Cells for Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis: A Phase I Study*” - **2021**
- **Nagroda Specjalna Rektora GUMed** za publikację „*Antigenic challenge influences epigenetic changes in antigen-specific T regulatory cells*” - **2021**
- **Nominacja do nagrody Naukowiec Przyszłości 2021** w kategorii: Nauka dla lepszego życia w przyszłości za realizację projektu badawczego pn. “Ocena antygenowo specyficznych limfocytów regulatorowych u dzieci ze świeżo rozpoznaną cukrzycą typu 1”.
- **Wyróżnienie w zakresie nauk medycznych** w Konkursie Oddziału PAN w Gdańsku dla młodych naukowców za najlepszą pracę twórczą opublikowaną w 2020 r.
 - „*Antigen-reactive regulatory T cells can be expanded in vitro with monocytes and anti-CD28 and anti-CD154 antibodies*” opublikowana w czasopiśmie *Cytotherapy*
- **22.05.2019:** Nagroda zespołowa (I miejsce) za prezentację “Modyfikacje histone H3 podczas hodowli limfocytów T regulatorowych”, III Międzynarodowa Konferencja Studenckich Kół Naukowych
- **Nominacja do Polskiej Nagrody Inteligentnego Rozwoju 2019** pod patronatem Prezes Urzędu Patentowego RP, dr Alicji Adamczak w kategorii: Naukowiec przyszłości za realizację projektu pn.: Ocena antygenowo specyficznych limfocytów regulatorowych u dzieci ze świeżo rozpoznaną cukrzycą typu 1
- **EFIS Travel Grant**, 5th European Congress of Immunology (ECI) – 2018 rok
- **EFIS Travel Grant**, 4th European Congress of Immunology (ECI), Austria – 2015 rok
- Przyznane **stypendium za osiągnięcia naukowe** w ramach projektu „Rozwój interdyscyplinarnych studiów doktoranckich na Politechnice Gdańskiej w zakresie nowoczesnych technologii” POKL.04.01.01-00-368/09 na rok akademicki 2013/2014
- **Stypendium wyjazdowe** w ramach Projektu “Rozwój interdyscyplinarnych studiów doktoranckich na Politechnice Gdańskiej w zakresie nowoczesnych technologii“ do KU Leuven w Belgii w 2013 roku

10. Członkostwo w organizacjach i stowarzyszeniach naukowych

- **Członek** Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej od 2015 roku
- **Członek** BM1305: Action to Focus and Accelerate Cell based Tolerance-inducing Therapies (A FACTT) od 2015 do 2017

11. Współpraca naukowa

W trakcie swojej pracy nawiązałam współpracę z wieloma ośrodkami naukowymi, zarówno krajowymi, jak i zagranicznymi, czego efektem są wieloosrodkowe publikacje. Należy tutaj zaznaczyć przede wszystkim publikację „Minimum Information about T Regulatory Cells: A Step toward Reproducibility and Standardization”, która pokazuje jak szerokie działania podjęliśmy by mogła ona powstać. W powstaniu artykułu wzięło udział aż 50 ośrodków naukowych z Europy, Stanów Zjednoczonych i Azji.

W trakcie kierowanego przeze mnie projektu LIDER nawiązałam również współpracę z:

- Politechniką w Dreźnie (Technische Universität Dresden, DRESDEN-concept Genome Center, Center for Molecular and Cellular Bioengineering (CMCB) oraz Technische Universität Dresden, DFG-Center for Regenerative Therapies Dresden Cluster of Excellence),
- Katedrą i Kliniką Pediatrii, Diabetologii i Endokrynologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego,
- Katedrą Anestezjologii i Intensywnej Terapii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego,
- Katedrą Medycyny Rodzinnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego,
- International Centre for Cancer Vaccine Science Uniwersytetu Gdańskiego,
- Kliniką Pediatrii, Diabetologii, Endokrynologii i Nefrologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi,
- Kliniką Pediatrii, Endokrynologii, Diabetologii z Pododdziałem Kardiologii Uniwersyteckiego Dziecięcego Szpitala Klinicznego im. L. Zamenhofs w Białymstoku
- Regionalnym Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Gdańsku

czego efektem była m.in. publikacja należąca do cyklu habilitacyjnego (Publikacja 2).

W trakcie ostatnich lat stale poszerzałam zakres swoich zainteresowań m.in. o zagadnienia związane ze stwardnieniem rozsianym i nawiązując współpracę z:

- Katedrą Neurologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
- Zakładem Radiologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
- Zakładem Fizjologii Człowieka Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
- Division of Immunology, LCMN, Germans Trias i Pujol University Hospital and Research Institute w Barcelonie (Hiszpania)
- Multiple Sclerosis Unit, Department of Neurosciences, Germans Trias i Pujol University Hospital w Barcelonie (Hiszpania)
- Department of Immunology, Institute for Biological Research “Siniša Stanković”- National Institute of Republic of Serbia, University of Belgrade w Belgradzie (Serbia)
- Department of Immunopathology, Sanquin Research w Amsterdamie (Holandia)
- Landsteiner Laboratory, Academic Medical Centre, University of Amsterdam w Amsterdamie (Holandia)
- San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (SR-Tiget), Division of Regenerative Medicine, Stem Cells and Gene Therapy, IRCCS San Raffaele Scientific Institute w Mediolanie (Włochy)
- MRC Centre for Transplantation, King’s College London w Londynie (Wielka Brytania).

czego efektem była m.in. publikacja należąca do cyklu habilitacyjnego (Publikacja 1).

12. Kursy, szkolenia i staże naukowe

Szkolenia

- **23 - 24.10.2021:** Szkolenie dla osób uczestniczących w wykonywaniu procedur na zwierzętach do celów naukowych, Gdańsk, Polska
- **14 - 15.12.2020:** Szkolenie ustawiczne “Aspekty formalne i praktyczne działalności banku tkanek i komórek wydających tkanki i komórki do zastosowań innowacyjnych, w tym terapii zaawansowanych”, Gdańsk, Polska

- **31.01.2019:** Szkolenie w zakresie obsługi i konserwacji system monitoring cząstek z oprogramowaniem Facility Pro SMART I licznikami IsoAir 301P, Gdansk, Polska
- **02.09.2018:** udział w One-day ECI satellite symposium „ENLIGHT-TENed by big data: advancing T cell immunology”, Amsterdam, Holandia
- **17.05.2018:** Szkolenie w zakresie „Obsługa Bioreaktora”, Sartorius Stedim Biotech, Gdansk, Polska
- **15.03.2018:** Szkolenie „Innowacyjne technologie do analizy komórek”, Merck, Gdańsk, Polska
- **12 - 14.02.2018:** Szkolenie „Zadania administratora danych osobowych w świetle zmian RODO 2018”, Gdańsk, Polska
- **24.05.2017:** Szkolenie „Wymogi higieny I standardy pracy w pomieszczeniach clean room zgodnie z normami PN-EN ISO14644 oraz GMP”, Warszawa, Polska
- **25.11.2016:** Szkolenie aplikacyjne z obsługi aparatu LightCycler96, Gdansk, Polska
- **27.02.2015 oraz 12-13.03.2015:** Szkolenie w zakresie obsługi BD LSR Fortessa™, BD FACSDiva™ Software ver.7.0., Gdańsk, Polska
- **13.03.2014 - 05.06.2014:** Szkolenie, "ABC of business", Course Topics: Legal and economic aspects of business, Gdańsk, Polska
- **13.12.2008 - 14.12.2008:** Szkolenie, Auditor Wewnętrzny Systemu HACCP, Gdańsk, Polska

Staże naukowe

- **01.05.-31.07.2013** – staż wyjazdowy dla doktorantów w ramach projektu "Rozwój interdyscyplinarnych studiów doktoranckich na Politechnice Gdańskiej w zakresie nowoczesnych technologii"
 - miejsce: Leuven, Belgia
 - instytucja badawcza: Katolicki Uniwersytet Lowański (KU Leuven)
 - opiekun naukowy instytucji zapraszającej: Prof. Wim Dehaene, Kierownik Katedry Chemii Organicznej
 - temat projektu: "Synthesis of highly functionalized pyrrole derivatives with a broad spectrum of biological activities by multicomponent reaction"

13. Recenzowanie publikacji w czasopismach międzynarodowych i krajowych

- Cells (IF=6,600)
- Genes (IF=4,096)
- International Journal of Environmental Research and Public Health (IF=3,390)
- Medicina (IF=2,430)
- Cancers (IF=6,639)
- Chemosensors (IF=3,398)
- Sensors (IF=3,576)
- Immunology Letters (3,276)
- Scientific Reports (IF=4,525)
- Central European Journal of Immunology (IF=1,455)

Od 2021 roku jestem stałym recenzentem wydawnictwa MDPI.

14. Działalność dydaktyczna

14.1. Nauczyciel akademicki

<p>2020-obecnie Pracownik badawczo-dydaktyczny</p>	<p>Zajęcia dydaktyczne ze studentami Wydziału Lekarskiego GUMed oraz Wydziału Farmaceutycznego GUMed <i>Specjalność:</i> Immunologia, Immunology, Immunopatologia <i>Prowadzone zajęcia:</i> seminarium, ćwiczenia, laboratorium <i>Język wykładowy:</i> polski oraz angielski</p>
<p>2019-2020 Pracownik badawczo-dydaktyczny</p>	<p>Zajęcia dydaktyczne ze studentami Wydziału Lekarskiego GUMed oraz Wydziału Farmaceutycznego GUMed <i>Specjalność:</i> Immunologia Kliniczna, Immunopatologia oraz Basic Immunology <i>Prowadzone zajęcia:</i> seminarium, ćwiczenia, laboratorium <i>Język wykładowy:</i> polski oraz angielski</p>
<p>2016-2019 Pracownik naukowy/badawczy</p>	<p>Zajęcia dydaktyczne ze studentami Wydziału Lekarskiego GUMed jako asystent prowadzącego <i>Specjalność:</i> Immunologia Kliniczna</p>

	<i>Prowadzone zajęcia: seminarium</i> <i>Język wykładowy: polski</i>
2010-2014 Doktorant	Zajęcia dydaktyczne ze studentami Technologii Chemicznej oraz Technologii Ochrony Środowiska Politechniki Gdańskiej <i>Specjalność: Chemia Organiczna</i> <i>Prowadzone zajęcia: seminaria, laboratoria, ćwiczenia</i> <i>Język wykładowy: polski</i>

14.2. Popularyzacja nauki, opieka nad magistrantami oraz doktorantami

08.06.2019 – organizacja stoiska podczas XIII edycji Pikniku Na Zdrowie

31.10.2016 – wizyta w Zespole Szkolno-Przedszkolnym w Borkowie w celu zaznajomienia z problemem cukrzycy oraz pracy naukowca

(https://www.facebook.com/permalink.php?story_fbid=1173021952733103&id=42524498084414)

26.11.2015 – wywiad pt. „Młodzi gdańscy naukowcy – z grantami, lecz bez etatu” dotyczący otrzymanego grantu LIDER finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju opublikowany na stronie www.gdansk.pl

Prace magisterskie

Martyna Pilecka	<i>„Dynamika zmian epigenetycznych w antygenowo-specyficznym limfocytach T regulatorowych”</i>	W trakcie realizacji	Opiekun pracy	
Mgr Karolina Dudulska	<i>„Poszukiwanie tolerogennych peptydów w chorobach autoimmunologicznych na przykładzie cukrzycy typu 1”</i>	2020	Opiekun pracy	
Mgr Magdalena Piotrowska	<i>„Zmiany epigenetyczne limfocytów T regulatorowych – implikacje dla terapii komórkowych”</i>	2019	Opiekun pracy	I miejsca w sesji medycznej na III Międzynarodowej Konferencji SKN

Mgr Monika Tarnowska	<i>„Telomery limfocytów T jako marker progresji cukrzycy typu 1 u dzieci”</i>	2017	Opiekun pracy	II miejsce w Konkursie Prac Magisterskich Absolwentów OML 2017 roku
-------------------------------------	---	-------------	---------------	---

Prace doktorskie

Mgr Magdalena Piotrowska	<i>„Zmiany epigenetyczne komórek układu odpornościowego jako czynnik wpływający na progresję cukrzycy typu 1”</i>	W trakcie realizacji	Promotor pomocniczy	
Dr n. med. Mateusz Gliwiński	<i>„Antygenowo-specyficzna regulacja układu odpornościowego w cukrzycy typu 1”</i>	2021	Promotor pomocniczy	Wyróżnienie Nagroda Zaufania Złoty OTIS 2021

15. Plany naukowe

Od 2014 roku konsekwentnie poszerzam swoją wiedzę na temat limfocytów T regulatorowych i ich wykorzystania w terapiach komórkowych, zwłaszcza w leczeniu cukrzycy typu 1 oraz stwardnienia rozsianego. Do tej pory kierowałem projektem LIDER, którego celem była próba otrzymywania komórek antygenowo-specyficznych wobec insuliny i peptydu 9-23 łańcucha β insuliny, która jest przedmiotem patentu (2021 rok) i kilku publikacji.

Kontynuując badania jestem w trakcie analizy, czy komórki uzyskane tą innowacyjną metodą nadają się do długotrwałej ekspansji bez utraty swoich właściwości i fenotypu. Określę zmiany molekularne zachodzące w poliklonalnych i antygenowo-specyficznych limfocytach T regulatorowych podczas ekspansji komórkowej. Badania te są realizowane w ramach projektu badawczego „Młody Twórca Nauki” Programu „Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza”. Chciałabym również otrzymać komórki specyficzne dla innych antygenów, m.in. pochodnych insuliny, które miałyby lepsze właściwości supresyjne, niż komórki poliklonalne, obecnie stosowane w leczeniu cukrzycy typu 1, a także pochodne białka osłonki

mielinowej w stwardnieniu rozsiałym oraz pochodne kolagenu w reumatoidalnym zapaleniu stawów.

Planowane są również badania nad ciekawym zjawiskiem trogocytozy, które może pomóc w lepszym zrozumieniu procesu prezentacji antygenów limfocytom T regulatorowym przez komórki APC w kontekście moich badań i autorskiego procesu generowania komórek Tregs.

Ponadto planuję przeanalizować materiał pochodzący od pacjentów z cukrzycą typu 1 pod kątem charakterystycznych i unikalnych peptydów pojawiających się w trakcie rozwoju choroby, które w przyszłości mogłyby posłużyć do rozwoju komórek o lepszej swoistości wobec tych antygenów. Wykorzystam również techniki molekularne i testy funkcjonalne, aby w pełni scharakteryzować otrzymane komórki.

Dodatkowo, w kolejnym etapie swoich badań chciałabym się skoncentrować na generowaniu i walidacji wprowadzania genu (knock-in) do komórek T regulatorowych z wykorzystaniem wektora lentiwirusowego. Obecnie jestem w trakcie przygotowywania wniosku grantowego na modyfikację genetyczną limfocytów T regulatorowych od pacjentów z cukrzycą typu 1 i generowanie populacji z nadekspresją wybranych genów. Grant ten pozwoli mi zdobyć zupełnie nową wiedzę z zakresu biologii molekularnej.

W międzyczasie będę dalej poszerzać wiedzę na temat chorób autoimmunologicznych i sposobach ich leczenia. Chciałabym również przejść dalsze szkolenia w zakresie technik molekularnych, które będę mogła wykorzystać w swoich badaniach.

Wszystkie te badania mają jeden cel – uzyskanie lepszych, skuteczniejszych i bezpieczniejszych komórek dla lepszego poziomu leczenia chorób autoimmunologicznych.

Oświadczam, iż nie ubiegałam się dotychczas o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

Dorota Iwaszkiewicz-Grześ