

10. Streszczenie

Jedną z kluczowych komórek stojących na straży integralności naszego organizmu są neutrofile, które stanowią pierwszą wyspecjalizowaną linię obrony przed patogenami. Definicja funkcji tej komórki w ostatnich latach uległa zmianie. Coraz więcej danych wskazuje, iż neutrofile mogą brać udział w regeneracji tkanki po zapaleniu. Braku specyficznego profilu czynników transkrypcyjnych jaki można by przypisać danej subpopulacji, luźno upakowana chromatyna jądrowa oraz relatywnie krótki czas życia neutrofilii wskazuje, iż zmiana ich właściwości musi odbywać się poprzez postranslacyjną modyfikację histonów – proces, który umożliwia pozycjonowanie genów do transkrypcji. Celem badań było zdefiniowanie mechanizmów kluczowych dla zmiany polaryzacji neutrofilii z komórek przygotowanych na neutralizację patogenów na komórki biorące udział w regeneracji tkanki. Wykazano, iż zmiany w funkcjonowaniu neutrofilii po stymulacji *in vitro* LPSEM (bezpośrednia aktywacja), TNF- α (stan praektywacji) oraz po IL-10 (neutrofile immunosupresorowe syntetyzujące IL-10) są wynikiem postanslacyjnej modyfikacji histony H3K4me3 i zmiany ścieżek aktywacji komórki zależnych od jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Analiza DNA związanego z H3K4me3 metodą ChIP-Seq pozwoliła na wskazanie miejsc startu transkrypcji genów (TSSs) związanych ze zmianą polaryzacji neutrofilii z komórek o profilu zapalnym na taki, który sprzyja regeneracji tkanki po zapaleniu. Z kolei analiza ontologii genów wykazała, iż pozycjonowane przez H3K4me3 geny związane są z procesami apoptozy, aktywacji neutrofilii w odpowiedzi na patogen, syntezę cytokin oraz zmianę modyfikację ścieżek aktywacji i genów przez nie uruchomianych. Obserwacje dokonane na poziomie genomu mają bezpośrednie przedłożenie na ekspresję genów związanych ze zmianą ścieżek aktywacji *via* NF- κ B. Dane te demonstrują, iż ludzkie neutrofile są komórkami, które nie tylko zdolne są do neutralizacji patogenów, ale także w przypadku gdy okres zapalania ulega wyciszeniu (co jest związane ze skuteczną eliminacją patogenów) neutrofile inicjują proces regeneracji tkanki poprzez zmianę profilu chemokin na taki, który rekrutuje komórki dendrtyczne, makrofagi, komórki progenitorowe oraz poprzez syntezę VEGF inicjując proces angiogenezy i remodelingu tkanki. Wyniki badań przeprowadzone na modelu *in vitro* zostały poddane walidacji i zestawione z wynikami uzyskanymi z analizy neutrofilii izolowanych od pacjentów, u których określony jest główny czynnik aktywujący neutrofile *in vivo* i korespondujący z modelem *in vitro*. Dodatkowa weryfikacja związana z aktywacją neutrofilii pozwoliła na wskazanie 19 miejsc wiązania DNA w obrębie histonu H3K4me3 związanych z aktywacją neutrofilii oraz 12 miejsc wiązania DNA

odpowiedzialnych za polaryzację neutrofilii w kierunku komórek immunosupresyjnych, które mogą być wykorzystane do celowanej, wysoce swoistej immunoterapii genowej.

11. Abstract

Neutrophils, recruited to the site of injury within minutes following trauma, are the hallmark of acute inflammation. Dependent on the infection risk, they can go two ways: as the resting cells they die by apoptosis (no infection) or receiving low proinflammatory signals from the state of inflammation they become pre-activated and subsequently, after diapedesis, activated to neutralize pathogens. New data suggested that neutrophils are not homogenous population. Observed that neutrophil heterogeneity is the result of their physiological activity alteration within infected and subsequently regenerated tissues. Demonstrated changes in the cell functioning that occur just after direct exposure to LPS (activation), TNF- α (pre-activation) and IL-10 (immunosuppression). Chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-Seq) analysis of histone H3K4me3 allowed us to identify various TSSs associated with plasticity and heterogeneity of human neutrophils. Gene Ontology analysis demonstrated great variation within target genes responsible for neutrophil activation, cytokine production, apoptosis, histone remodelling as well as NF- κ B transcription factor pathways and allowed us to indicate specific target genes within H3K4me3. Changes within H3K4me3 correspond with different gene expression related to NF- κ B and apoptosis; as well as neutrophil ability to ROS production, phagocytosis, CD11b/CD18 expression, apoptosis and specific profile of cytokines/chemokines/growth factors during direct stimulation of neutrophils by IL-10 or LPS but not by pre-activating concentration of TNF- α . These studies also presented unexpected properties of IL-10-induced apoptotic neutrophils as transcriptionally active cells, which engagement in alternative NF- κ B pathway changes specific profile of cytokines/chemokines/growth factors desired in resolving inflammation. The *in vitro* model were validated to the clinical state of these cells observed in sepsis (mimic of LPS-stimulated neutrophils), Neuromyelitis Optic Spectrum Disorders (reflected by TNF- α pre-activation) and periodontal disease a few days after acute disease symptoms, during the tissue recovery (mimic of IL-10-exposed neutrophils).