



2 – Autoreferat

Dr Edyta Gendaszewska-Darmach

Politechnika Łódzka
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności

AUTOREFERAT

**przedłożony Centralnej Komisji
do Spraw Stopni i Tytułów**

Łódź, 2016

1. Imię i Nazwisko

Edyta Gendaszewska-Darmach

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

- | | |
|------|--|
| 1995 | Magister biologii
Specjalność: biologia molekularna
Katedra Cytobiochemii
Wydział Biologii i Nauk o Ziemi
Uniwersytet Łódzki
Tytuł pracy magisterskiej: „ <i>Analiza specyficzności komórkowej i gatunkowej glikoprotein jądrowych</i> ”.
Promotor: prof. dr hab. Anna Lipińska |
| 2002 | Stopień naukowy doktora nauk chemicznych
w zakresie chemii bioorganicznej
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych
Polska Akademia Nauk w Łodzi
Temat rozprawy doktorskiej: „ <i>Wpływ mononukleotydów i ich tiofosforanowych analogów na wzrost wybranych linii komórkowych - rola 5'-nukleotydu</i> ”.
Promotor: prof. dr hab. Maria Koziółkiewicz |

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

- | | |
|--------------|---|
| 1995-2005 | Asystent
Zakład Chemii Bioorganicznej,
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi |
| 2006-2007 | Asystent
Instytut Biochemii Technicznej
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka |
| 2007-obecnie | Adiunkt
Instytut Biochemii Technicznej
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka |

4. Wskazanie 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) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego,

TIOFOSFORANOWE ANALOGI NUKLEOTYDÓW I LIZOFOSFOLIPIDÓW
JAKO STABILNE MODULATORY SZLAKÓW SYGNAŁOWYCH

B) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy),

H-1 Gendaszewska-Darmach E, Maszewska M, Zakł $\acute{o}$ s M, Kozi $\acute{o}$ lkiewicz M. Degradation of extracellular nucleotides and their analogs in HeLa and HUVEC cell cultures. *Acta Biochim Pol.*, 50(4): 973-84 (2003)

MNiSW - 15*, IF₂₀₀₃ = 0.629, IF₂₀₁₅ = 1.489, (5 LETNI IF = 1.422) CIT – 22

H-2 Gendaszewska-Darmach E., Kucharska M. Nucleotide receptors as targets in the pharmacological enhancement of dermal wound healing. *Purinergic Signal.*, 7(2): 193-206 (2011)

MNiSW - 25*, IF₂₀₁₁ = 3.164, IF₂₀₁₅ = 3.196, (5 LETNI IF = 3.278) CIT – 20

H-3 Gendaszewska-Darmach E, Laska E, Rytczak P, Okruszek A. The chemical synthesis of metabolically stabilized 2-OMe-LPA analogues and preliminary studies of their inhibitory activity toward autotoxin. *Bioorg Med Chem Lett.*, 22(8): 2698-2700 (2012)

MNiSW - 25*, IF₂₀₁₂ = 2.338, IF₂₀₁₅ = 2.486, (5 LETNI IF = 2.303) CIT – 8

H-4 Grzelczyk A, Gendaszewska-Darmach E. Novel bioactive glycerol-based lysophospholipids: new data - new insight into their function. *Biochimie*, 95(4): 667-679 (2013)

MNiSW - 25*, IF₂₀₁₃ = 3.123, IF₂₀₁₅ = 3.017, (5 LETNI IF = 3.102) CIT – 34

H-5 Rytczak P, Drzazga A, Gendaszewska-Darmach E, Okruszek A. The chemical synthesis and cytotoxicity of new sulfur analogues of 2-methoxy-lysophosphatidylcholine. *Bioorg Med Chem Lett.*, 23 (24): 6794-6798 (2013)

MNiSW - 25*, IF₂₀₁₃ = 2.331, IF₂₀₁₅ = 2.486, (5 LETNI IF = 2.303) CIT – 2

H-6 Drzazga A, Ciesielska A, Gendaszewska-Darmach E. Sulfur- and acyl chain-dependent influence of 2-methoxy-lysophosphatidylcholine analogues on β pancreatic cells. *Curr Top Med Chem.* 15(23): 2395-2405 (2015)

MNiSW - 35*, IF₂₀₁₅ = 2.900, (5 LETNI IF = 2.998) CIT – 1

H-7 Węglowska E, Szustak M, **Gendaszewska-Darmach E**. Proangiogenic properties of nucleoside 5'-O-phosphorothioate analogues under hyperglycaemic conditions. *Curr Top Med Chem*. 15 (23), 2464-74 (2015)

MNiSW - 35*, IF₂₀₁₅ = 2.900, (5 LETNI IF = 2.998) CIT – 1

H-8 **Gendaszewska-Darmach E**, Szustak M. Thymidine 5'-O-monophosphorothioates induces HeLa cell migration by activation of the P2Y6 receptor. *Purinergic Signal*. 12 (2): 199-209 (2016)

MNiSW - 25*, IF₂₀₁₅ = 3.196, (5 LETNI IF = 3.278) CIT – 0

H-9 **Gendaszewska-Darmach**, Edyta Węglowska, Aurelia Walczak-Drzewiecka, Kaja Karaś. Nucleoside 5'-O-monophosphorothioates as modulators of the P2Y14 receptor and mast cell degranulation. *Oncotarget* 7(43): 69358-69370 (2016)

MNiSW - 40*, IF₂₀₁₅ = 5.008 (5 LETNI IF = 5.883) CIT – 0

* pkt MNiSW – punkty zgodne z wykazem opublikowanym przez MNiSW w dniu 23 grudnia 2015 roku

Wymienione artykuły dołączone zostały w *Załączniku 5* i cytowane są w tekście z literą 'H' przed numerem odnośnika (np. [H-1]). Do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego dołączono oświadczenia współautorów pracy określające indywidualny wkład każdego z nich w jej powstanie (*Załącznik 6*).

PODSUMOWANIE DOROBKU NAUKOWEGO (DANE SCJENTOMETRYCZNE NA DZIEŃ 28 PAŹDZIERNIKA 2016)	
Sumaryczny <i>Impact Factor</i> cyklu publikacji będących podstawą do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego w dziedzinie nauk technicznych, w dyscyplinie biotechnologia (zgodnie z rokiem opublikowania).	25.60
Sumaryczny <i>Impact Factor</i> wszystkich prac (zgodnie z rokiem opublikowania).	50.67
Ilość punktów zgodnie z kryteriami Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego opublikowanymi w komunikacie Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w sprawie wykazu czasopism naukowych z 23 grudnia 2015 roku	490
Index Hirscha według Web of Science	9
Liczba cytowań według Web of Science	185
Liczba cytowań bez autocytowań według Web of Science	157

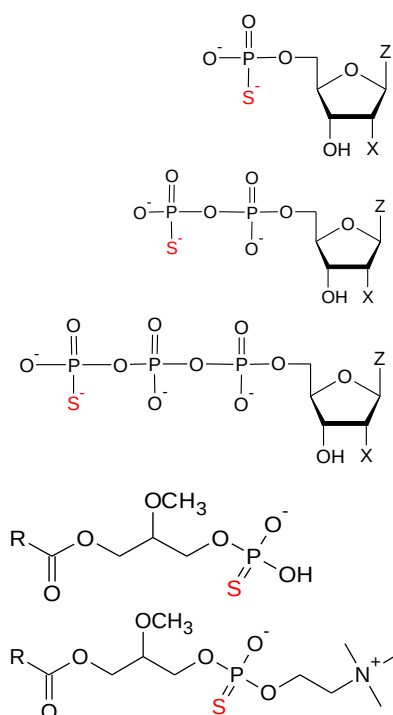
* w przypadku, gdy osiągnięciem tym jest praca/ prace wspólne, należy przedstawić oświadczenia wszystkich jej współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w jej powstanie

C) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Podstawą wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego są oryginalne wyniki badań oraz dwie publikacje przeglądowe przedstawione w cyklu 9 artykułów naukowych powiązanych tematycznie i opublikowanych w czasopismach z *Thomson Reuters Master Journal List* (tzw. listy filadelfijskiej) ujętych w zbiorach *Journal Citation Report* (JCR).

Publikacje łączą obiekty badań w postaci niskocząsteczkowych modyfikowanych siarką ligandów receptorów sprzężonych z białkami G (GPCR), a mianowicie tiofosforanowe pochodne nukleotydów oraz lizofosfolipidów (Rys. 1).

TIOFOSFORANOWE ANALOGI NUKLEOTYDÓW I LIZOFOSFOLIPIDÓW



- **MODULACJA SZLAKÓW SYGNAŁOWYCH, W TYM SYGNALIZACJI ZWIĄZANEJ Z CUKRZYCĄ**
- **GOJENIE RAN PRZEWLEKŁYCH, W TYM RAN CUKRZYCOWYCH**

STABILNOŚĆ METABOLICZNA

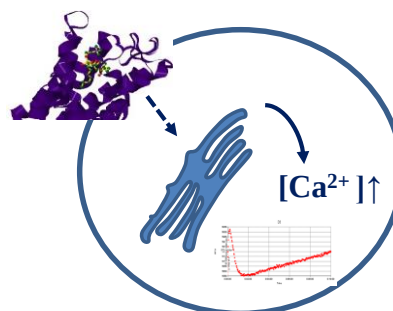
EFEKTY DŁUGOTERMINOWE

- Przeżywalność komórek
- Proliferacja komórek
- Migracja komórek

TESTY FUNKCJONALNE

- Sekrecja VEGF
- Sekrecja insuliny
- Inhibicja autotaksyny
- Degranulacja komórek tucznych

IDENTYFIKACJA RECEPTORÓW GPCR



Rysunek 1. Aktywność biologiczna i mechanizmy działania tiofosforanowych analogów nukleotydów i lizofosfolipidów; R: reszta kwasu tłuszczowego; X: O lub H; Z: zasada azotowa

C.1 Określenie wpływu enzymów degradujących nukleotydy oraz składu podłoża hodowlanego dla komórek HeLa i HUVEC na aktywność zewnątrzkomórkowych nukleotydów i ich tiofosforanowych analogów [H-1]

Zewnątrzkomórkowe nukleotydy, uwalniane między innymi w odpowiedzi na stres bądź uszkodzenia komórek, pośredniczą w przekazywaniu sygnałów ze środowiska zewnętrznego do wnętrza komórki za pośrednictwem specyficznych białek receptorowych. Istnienie specyficznych receptorów błonowych aktywowanych przez ATP (5'-trifosforan adenozyne) zaobserwował już w roku 1972 Geoffrey Burnstock, który w 1976 roku nazwał grupę receptorów aktywowanych przez adenozyne oraz ATP i ADP (difosforan adenozyne) „purynergicznymi” lub receptorami P2 [Burnstock, 1976]. Późniejsze badania wykazały, że również nukleotydy pirymidynowe, takie jak UTP (trifosforan urydyny) oraz UDP (difosforan urydyny), posiadają swoje receptory o strukturze i farmakologii podobnej do receptorów klasy P2. Dokonano więc weryfikacji nazwy całej klasy, którą obecnie określa się mianem „receptorów nukleotydowych” [Fredholm *et al.*, 1997]. Dotychczas zidentyfikowano 7 podtypów aktywowanych przez ATP kanałów jonowych P2X (P2X1-P2X7) i 8 podtypów receptorów GPCR typu P2Y (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13, P2Y14). Każdy spośród receptorów P2Y ulega aktywacji pod wpływem kilku różnych nukleotydów (Tabela 1), w odróżnieniu od kanałów jonowych P2X, które w sposób niespecyficzny mogą ulegać aktywacji jedynie pod wpływem ATP [Burnstock, 2006].

Tabela 1. Receptory nukleotydowe P2Y w zestawieniu z naturalnymi ligandami oraz rodziną białek G ulegających aktywacji wewnątrz komórki [Burnstock, 2006].

Receptor	Naturalny ligand	Rodzina aktywowanych białek G
P2Y1	ADP, ATP	Gq/11
P2Y2	UTP, ATP	Gq/11
P2Y4	UTP, ATP	Gq/11
P2Y6	UDP	Gq/11
P2Y11	ATP	Gq/11, Gs
P2Y12	ADP	Gi/o
P2Y13	ADP	Gi/o
P2Y14	UDP-glukoza	Gi/o

Większość badań dotyczących roli ligandów receptorów nukleotydowych dotyczy analizy szlaków sygnalizacyjnych oraz poziomu specyficznych przekaźników, takich jak stężenie jonów Ca²⁺ lub zmiana poziomu cyklicznego AMP. Jednakże zewnątrzkomórkowe nukleotydy wpływają nie tylko na poziom w/w przekaźników, ale także na procesy

długoterminowe, takie jak proliferacja i śmierć komórek, ich migracja, czy wydzielanie czynników wzrostu [Burnstock, 2002]. Badania nad efektami długoterminowymi wymagają także odpowiednio długiej inkubacji komórek z nukleotydowym ligandem. W takich warunkach nukleotydy podane do hodowli komórkowych *in vitro* lub wykorzystywane w badaniach *in vivo* ulegają hydrolizie przez ekto-enzymy związane z błoną komórkową lub enzymy obecne w surowicy, będącej standardowym składnikiem wielu podłoży hodowlanych. Do najbardziej znanych grup ekto-enzymów należą: ekto-difosfohydrolazy trifosforanów nukleozydów E-NTPDazy (ang. *Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase*), ekto-pirofosfatazy/fosfodiesterazy nukleotydowe E-NPPazy (ang. *Ecto-Phosphodiesterase/Nucleotide Pyrophosphatase*), ekto-5'-nukleotydaza oraz alkaliczna fosfataza [Yegutkin, 2008]. Odpowiedniki wymienionych rodzin enzymów obecne są także w postaci rozpuszczalnej w surowicy krwi, przy czym poziom i/lub ich aktywność zależy od gatunku. Stwierdzono np., że NPP obecną w płodowej surowicy bydlęcej FBS (ang. *Fetal Bovine Serum*) cechuje wyższa aktywność niż aktywność ludzkiej NPP [Wójcik, praca doktorska, 2001]. W przypadku ATP i ADP, ostateczny produkt aktywności ekto-enzymów oraz enzymów obecnych w surowicy (adenozyna) może ulec kolejnym przemianom do inozyny w wyniku działania ekto-deaminazy adenozyny i/lub jej rozpuszczalnej formy [Yegutkin *et al.*, 2003].

Aby ograniczyć proces enzymatycznej degradacji nukleotydów przez enzymy surowicze w warunkach hodowli *in vitro*, stosowane są dwa podejścia: wykorzystanie chemicznie modyfikowanych tzw. stabilnych metabolicznie analogów nukleotydów lub użycie specjalistycznych podłoży hodowlanych niewymagających obecności surowicy. Chociaż wykorzystanie tego typu medium hodowlanego może znacząco zwiększyć stabilność nukleotydów, to efekt działania badanych związków może być odmienny niż ten obserwowany dla nukleotydów inkubowanych z komórkami w standardowym medium zawierającym np. FBS, co udowodniłam w publikacji “Degradation of extracellular nucleotides and their analogs in HeLa and HUVEC cell cultures” [*Acta Biochim Pol.*, 50(4):973-84 (2003); H-1]. W w/w pracy zastosowałam komercyjnie dostępny zamiennik surowicy TCH (Defined Serum Replacement), pozwalający na długotrwałą hodowlę wielu typów linii komórkowych. Jako modele komórkowe wykorzystałam szeroko stosowaną w laboratoriach na całym świecie linię ludzkich komórek nabłonkowych pochodzących z raka szyjki macicy HeLa oraz prawidłowe ludzkie komórki śródbłónka wyizolowane z żyły pępowinowej HUVEC (ang. *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*). W medium RPMI 1640 zawierającym suplement TCH komórki zachowywały charakterystyczną morfologię, a analiza katabolizmu nukleotydów inkubowanych w obecności w/w medium z

wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej wykazała, że podłoże to nie posiada żadnej aktywności nukleolitycznej, w przeciwieństwie do podłoża zawierającego dodatek surowicy FBS. Dlatego każda aktywność nukleolityczna obserwowana w hodowli komórek, prowadzonej z użyciem zamiennika TCH, mogła być przypisana ekto-enzymom obecnym na ich powierzchni.

W szczególności poddałam analizie stabilność niemodyfikowanych nukleotydów, będących znanymi ligandami receptorów P2Y (ATP, ADP, UTP, UDP) oraz analogów zaprojektowanych w celu zwiększenia ich oporności na działanie enzymów nukleolitycznych (analogi 5'-tiofosforanowe i analogi zawierające mostek metylenowy w pozycjach α,β oraz β,γ). Analiza HPLC wykazała, że badane analogi także mogą w pewnym stopniu ulegać degradacji pod wpływem ekto-enzymów hydrolizujących nukleotydy. Głównymi produktami degradacji 5'-O- γ -tiotrifosforanu adenozyiny (ATP γ S) oraz metylenowej pochodnej β,γ -metyleno-ATP w hodowli komórek HeLa były adenozyinomonofosforan oraz adenozyina, co wskazuje na wysoką aktywność ekto-pirofosfataz/fosfodiesteraz nukleotydowych na powierzchni komórek. W tych samych warunkach α,β -metyleno-ATP ulegał degradacji pod wpływem ATPazy do α,β -metyleno-ADP. Dodatkowo, na powierzchni komórek HeLa wysoką aktywność wykazywała także ekto-5'-nukleotydaza. Obecność trzech wymienionych enzymów prowadziła do degradacji nie tylko nukleotydów niemodyfikowanych, ale w znacznym stopniu także tiofosforanowych i metylenowych pochodnych. Jedynym nukleotydem nieulegającym degradacji okazał się być 5'-O- β -tiodifosforan adenozyiny (ADP β S).

Inny profil degradacji badanych związków obserwowano w hodowli komórek śródbłonna wyizolowanych z żyły pępowinowej HUVEC. Głównym enzymem odpowiadającym za hydrolizę zewnątrzkomórkowych nukleotydów w hodowli tych komórek okazała się być ekto-ATPDaza, podczas gdy E-NPPazy odgrywały niewielką rolę. Obserwacja ta świadczy o komórkowo-specyficznej i zróżnicowanej ekspresji enzymów degradujących nukleotydy. Dodatkowo, nukleozydy adeninowe powstające pod wpływem działania enzymów nukleolitycznych ulegają dalszej konwersji do inozyny. Proces ten jest katalizowany przez deaminazę adenozyiny, która występuje w dużej ilości w surowicy FBS stosowanej jako składnik podłoży hodowlanych. Aktywności tej nie obserwowano w przypadku zastosowania suplementu surowicy TCH.

Nieoczekiwanym wynikiem była obserwacja, że zastąpienie surowicy FBS suplementem TCH znacząco zmienia działanie nukleotydów na komórki, przy czym efekt ten był szczególnie widoczny w przypadku nukleotydów zawierających adenozyinę (ATP, ADP, a w mniejszym stopniu ATP γ S i ADP β S). Związki te okazały się wysoce toksyczne w stosunku

do komórek HeLa hodowanych w podłożu zawierającym suplement TCH, lecz toksycznego wpływu nie obserwowano w standardowym podłożu RPMI 1640 zawierającym 10% FBS. Z drugiej strony, analizowane nukleotydy pirymidynowe (UTP, UDP, 5'-O-monotiofosforan tymidyny TMPS, 5'-O-monotiofosforan urydyny UMPS) nie wykazywały toksyczności zarówno w podłożu z dodatkiem FBS, jak również w podłożu zawierającym suplement TCH. Wysoka cytotoksyczność, obserwowana zwłaszcza w przypadku nukleotydów niemodyfikowanych (ATP i ADP) i w mniejszym stopniu ich tiofosforanowych analogów (ATP γ S i ADP β S) w podłożu z dodatkiem TCH, jest bowiem spowodowana uwalnianiem i gromadzeniem toksycznej adenozyiny. W podłożu hodowlanym zawierającym w swoim składzie surowicę, adenozyina jest natychmiast przekształcana do nietoksycznej inozyiny przez obecną w FBS deaminazę adenozyinową.

Wyniki badań przedstawionych w publikacji H-1 jednoznacznie wskazują, że wykorzystanie zamienników surowicy może znacząco zwiększyć stabilność nukleotydów, jednak obserwowany efekt biologiczny badanych nukleotydów może być inny niż w przypadku nukleotydów inkubowanych z komórkami w standardowych podłożach zawierających surowicę. Należy przy tym zaznaczyć, że ten drugi wariant jest bardziej zbliżony do warunków panujących *in vivo*. Obecne w surowicy enzymy (np. deaminaza adenozyiny) są odpowiedzialne za istotne przemiany nukleotydów i ich metabolitów i wpływają znacząco na końcowy efekt.

Innym wnioskiem płynącym z przedstawionych badań jest obserwacja, że niektóre tzw. „niehydrolizowalne” analogi nukleotydów (np. tiofosforanowy analog ATP, w którym atom siarki znajduje się w terminalnej grupie fosforanowej) mogą być w pewnym stopniu degradowane przez ekto-enzymy komórkowe lub białka obecne w surowicy. Mimo że związki te są odporne na działanie E-NTPDaz, które mają zdolność hydrolizy 5'-tri- lub 5'-difosforanów nukleotydów do monofosforanów nukleotydów oraz nieorganicznego fosforanu, mogą być substratami dla ekto-pirofosfataz/fosfodiesteraz nukleotydowych. Mechanizm działania E-NPPaz polega bowiem na ataku na atom fosforu, znajdujący się w pozycji α lub γ [Gijssbers *et al.*, 2001]. Z powodu takiej preferencji E-NPPaz jedynie 5'-O- β -tiodifosforan adenozyiny był całkowicie odporny na degradację enzymatyczną, podczas gdy 5'-O- γ -tiotrifosforan adenozyiny ulegał częściowej hydrolizie.

C.2 Receptory nukleotydowe jako cel w leczeniu ran: określenie aktywności tiofosforanowych ligandów receptorów P2Y [H-2, H-7]

Niestety, moje dalsze badania nad aktywnością biologiczną mononukleotydów i ich tiofosforanowych analogów musiały, z wielu powodów, w tym ze względów rodzinnych, ulec

zawieszeniu. Ich kontynuacja stała się możliwa dopiero po kilku latach. Temat aktywności biologicznej mononukleotydów i ich tiofosforanowych analogów nie został w tym czasie rozwiązany przez innych naukowców zajmujących się transdukcją sygnałów komórkowych z udziałem receptorów P2Y.

W roku 2006 rozpoczęłam pracę w kierowanym przez profesora Stanisława Bieleckiego Instytucie Biochemii Technicznej na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej. W Instytucie Biochemii Technicznej opracowano między innymi metodę otrzymywania bionanocelulozy (BNC) syntetyzowanej przez szczep bakterii octowych *Gluconacetobacter xylinus*. BNC, ze względu na swoje właściwości (m.in. biokompatybilność, higroskopijność i przepuszczalność dla gazów) należy do biomateriałów stwarzających sprzyjające środowisko dla procesu gojenia ran [Czaja *et al.*, 2006; Gama *et al.*, 2016]. Ze względu na fakt, że nukleotydy obecne w środowisku zewnątrzkomórkowym biorą udział we wszystkich fazach procesu gojenia ran, moje zainteresowania naukowe bardzo szybko rozciągnęły się na możliwość zastosowania tiofosforanowych ligandów receptorów nukleotydowych jako czynników stymulujących gojenie ran przewlekłych.

Przewlekłe gojenie ran stanowi obecnie poważny problem ze względu na częstość występowania i towarzyszące powikłania, a stosowane obecnie systemy lecznicze nie są w pełni skuteczne. Rany chroniczne, do których zalicza się między innymi owrzodzenia, odleżyny czy rany cukrzycowe są także poważnym powikłaniem wielu chorób, które związane są z miejscową redukcją przepływu krwi w naczyniach żylnych, tętniczych, a także w mikrokrążeniu. Czynnikiem sprzyjającym może być nadciśnienie tętnicze, otyłość, infekcje oraz cukrzyca [Werdin *et al.*, 2009]. Z tych względów badania nad metodami przyspieszającymi proces gojenia ran są szybko rozwijającym się obszarem nauk biomedycznych. Wielki postęp w tej dziedzinie był możliwy dzięki syntezie dużej ilości cząsteczek przyspieszających proces gojenia, które naśladują naturalnie występujące w mikrośrodku rany białkowe czynniki wzrostowe. Do najważniejszych należy rekombinowany ludzki czynnik wzrostu BB pochodzenia płytkowego (rhPDGF-BB) zatwierdzony jako lek przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA) oraz Europejską Agencję Leków (EMA) do leczenia owrzodzeń podudzi. Ostatnie analizy wskazują jednak, że skuteczność kliniczna białkowych czynników wzrostu jest ograniczona, co wynika z faktu, że mogą one podlegać inaktywacji w wyniku miejscowego działania proteaz [Papanas i Maltezos; 2007]. Dlatego trwają intensywne badania nad substancjami, które zachowują swoją biologiczną aktywność w mikrośrodku rany. Do grupy tej należą syntetyczne związki o działaniu proangiogennym, gdyż proces angiogenezy jest czynnikiem krytycznym w procesie gojenia się rany [Gurtner *et al.*, 2008] Zastosowanie

niskocząsteczkowych związków chemicznych stymulujących proces angiogenezy jest korzystne ze względu na mniejszy koszt ich produkcji oraz brak ograniczeń cechujących białkowe czynniki wzrostu. W kontekście powikłań cukrzycowych w procesie gojenia oraz w kontekście mechanizmów molekularnych regulujących ten proces duże nadzieje wiąże się z receptorami nukleotydowymi P2Y oraz ich specyficznymi ligandami [Gendaszewska-Darmach i Kucharska, 2011].

Jak już wcześniej wspomniałam, potencjał terapeutyczny naturalnie występujących zewnątrzkomórkowych nukleotydów jest ograniczony, ponieważ są one szybko degradowane przez liczne ekto-enzymy oraz białka obecne w surowicy krwi. Z myślą o zastosowaniu modyfikowanych nukleotydów w aspekcie stymulacji gojenia ran zrodził się pomysł na projekt złożony przeze mnie do Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego zatytułowany „Synteza i badania biologiczne nowych ligandów receptorów nukleotydowych stymulujących proces gojenia ran. Identyfikacja mechanizmu molekularnego” (N N405 304736). Projekt ten uzyskał finansowanie, a jego realizacja rozpoczęła się 29 kwietnia 2009 roku (termin zakończenia: 28 stycznia 2012 roku). Przedmiotem prac realizowanych w ramach w/w projektu badawczego była przede wszystkim synteza i badania biologiczne tiofosforanowych analogów nukleotydów pirymidynowych. Związki te zostały zsyntetyzowane w Instytucie Biochemii Technicznej PŁ przez mgr inż. Martę Kucharską (obecnie Marta Kucharska-Rytczak), pod kierunkiem prof. dr hab. Andrzeja Okruszka. Wszystkie badania biologiczne były realizowane bezpośrednio przeze mnie lub pod moim kierunkiem, a ich wyniki zostaną zaprezentowane później w ramach niniejszego autoreferatu. W tym czasie rozpoczęłam też opiekę naukową nad doktorantką - mgr inż. Edytą Laską (obecnie Edyta Węglowska), której stałam się wkrótce promotorem pomocniczym. Rozprawa doktorska mgr Węglowskiej, zatytułowana „Tiofosforanowe analogi nukleotydów - ligandy receptorów P2Y stymulujące proces gojenia w warunkach hiperglikemicznych: badania *in vitro*” była realizowana pod kierunkiem prof. dr hab. Marii Koziółkiewicz. Realizując projekt wprowadzałam doktorantkę w tajniki pracy z hodowlami komórek ludzkich, analizy przeżywalności i proliferacji komórek oraz w metodologię badań molekularnych, opartych m.in. na izolacji całkowitej puli RNA, RT-PCR z pomiarem ilości produktu w czasie rzeczywistym, transfekcji komórek, analizie mobilizacji wewnątrzkomórkowych jonów wapnia, testach immunoenzymatycznych ELISA, itp.

W toku realizacji projektu oraz w miarę gromadzenia doświadczeń, powstał przegląd, napisany w głównej mierze przeze mnie z udziałem mgr inż. Marty Kucharskiej [“Nucleotide receptors as targets in the pharmacological enhancement of dermal wound healing”. *Purinergic Signal.*, 7(2): 193-206 (2011); H-2], który koncentruje się na roli receptorów

nukleotydowych P2X i P2Y oraz ich ligandów w poszczególnych fazach procesu gojenia. W pracy scharakteryzowano także cztery etapy gojenia, które nakładają się na siebie w czasie i przestrzeni: hemostaza, faza zapalna, faza proliferacyjna i przebudowa blizny. We wszystkich fazach szczególne znaczenie ma proces angiogenezy - powstawanie nowych naczyń krwionośnych na bazie już istniejących. W artykule zwrócono szczególną uwagę na znaczącą rolę nukleotydów w regulacji licznych procesów zachodzących podczas poszczególnych faz procesu gojenia ran w organizmie i związane z tym możliwości terapeutyczne. Omówiona jest także ekspresja poszczególnych receptorów P2X i P2Y w komórkach kluczowych dla gojenia. W ramach realizacji projektu własnego „Synteza i badania biologiczne nowych ligandów receptorów nukleotydowych stymulujących proces gojenia ran. Identyfikacja mechanizmu molekularnego” poddano analizie aktywności biologicznej szereg tiofosforanowych analogów nukleotydów. Modelami komórkowymi wykorzystywanymi w ramach realizacji projektu były komórki budujące skórę: ludzkie pierwotne fibroblasty HDFa (ang. *Human Dermal Fibroblasts, adult*) i keratynocyty linii HaCaT (ang. *Human Skin Keratinocytes*). W pracy wykorzystywano też ludzkie komórki śródbłónka izolowane z żyły pępowinowej HUVEC jako kluczowy model dla procesu angiogenezy. Pod koniec projektu, a także podczas jego kontynuacji wprowadziłam do większości analiz wariant hodowli komórek w warunkach hiperglikemicznych, co miało na celu zbliżenie do warunków panujących w ranach cukrzycowych. Hiperglikemia upośledza bowiem proces gojenia ran, a w szczególności przebieg angiogenezy [Jazwa *et al.*, 2006], zmniejsza tempo procesu proliferacji keratynocytów, fibroblastów oraz komórek śródbłónka [Sharma *et al.*, 2006], a ponadto sprzyja zwiększeniu produkcji reaktywnych form tlenu [Schaeffer *et al.*, 2003]. Kontynuacja badań była możliwa między innymi w ramach finansowania uzyskanego z Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu PRELUDIUM, którego kierownikiem była mgr inż. Edyta Węglowska („Tiofosforanowe analogi nukleotydów pirymidynowych jako wielofunkcyjne ligandy receptorów P2Y₆ i P2Y₁₄ w warunkach hiperglikemii” (012/05/N/NZ5/02626)).

Analizie poddano wpływ badanych nukleotydów na przeżywalność i proliferację keratynocytów, fibroblastów i komórek śródbłónka oraz wydzielanie przez keratynocyty i fibroblasty kluczowego dla angiogenezy białkowego czynnika wzrostu śródbłónka naczyń VEGF (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*). Zbadano też profile ekspresji genów kodujących receptory nukleotydowe w badanych modelach komórkowych. W celu bezpośredniej oceny proliferacji komórek zastosowano test CyQUANT® Direct Cell Proliferation Assay, który pozwala na ilościowe wyznaczenie komórkowego DNA przez barwnik fluorescencyjny. Wykorzystano także test PrestoBlue™ Cell Viability Reagent, aby ocenić aktywność metaboliczną komórek (przeżywalność), poprzez pomiar stopnia redukcji

rezazuryny przez reduktazy mitochondrialne. Wyniki dotyczące zróżnicowanego wpływu niemodyfikowanych di- i trifosforanów nukleozydów oraz ich tiofosforanowych analogów na proliferację komórek zostały opisane w publikacji „Proangiogenic properties of nucleoside 5'-O-phosphorothioate analogues under hyperglycaemic conditions” [Curr Top Med Chem. 15 (23), 2464-74 (2015); H-7]. Badane nukleotydy największy wpływ wywierają na keratynocyty linii HaCaT. Najbardziej efektywne w intensyfikacji metabolicznej aktywności komórek HaCaT oraz, w mniejszym stopniu, w stymulacji ich proliferacji były trifosforan i α -tiotrifosforan urydyny, zarówno w podłożu o normalnym (25 mM), jak i w podwyższonym (50 mM) stężeniu glukozy. Z kolei ATP i jego analogi pozostały nieaktywne. Zarówno UTP, jak również ATP należą do agonistów receptora P2Y₂, którego wysoką ekspresję w komórkach HaCaT również wykazano w w/w pracy H-7. Receptor P2Y₂ jest zaangażowany w proliferację keratynocytów, natomiast aktywowany przez ATP P2X₅ jest prawdopodobnie związany z procesem ich różnicowania. Obecność produktu ekspresji genu P2X₅ została również przez nas udowodniona. Wysoką aktywność wykazywały też UDP i UDP β S, będące agonistami receptora P2Y₆.

Z kolei stężenie czynnika VEGF wydzielanego przez komórki inkubowane w obecności nukleotydów oceniano metodą immunoenzymatyczną ELISA w oparciu o test VEGF Human ELISA Kit firmy Life Technologies. VEGF jest produkowany przez wiele typów komórek, które uczestniczą w procesie gojenia. Oprócz keratynocytów i fibroblastów białko to wydzielają również komórki mięśni gładkich, płytki krwi, neutrofile, makrofagi, a także niektóre komórki śródbłónka [Bao *et al.*, 2009]. Wcześniejsze dane wskazywały, że aktywacja płytek krwi przez ADP za pośrednictwem receptorów P2Y₁ i P2Y₁₂ powoduje wzrost stężenia wydzielanego VEGF [Bambace *et al.*, 2010]. ATP i UTP przyczyniają się do zwiększenia ilości VEGF wydzielanego z fibroblastów także za pośrednictwem receptora P2Y₂ [Jin *et al.*, 2014]. Spośród tiofosforanowych analogów nukleotydów do chwili obecnej jedynie ATP γ S został zbadany pod kątem jego wpływu na wydzielanie białka VEGF-A. Autorzy udowodnili, że w ludzkich komórkach dendrytycznych pochodzenia monocytarnego inkubowanych w obecności γ -tiofosforanu adenozyiny ma miejsce wzrost ekspresji genu VEGF-A, jak również zwiększenie sekrecji samego białka [Bles *et al.*, 2007]. Uzyskane przez nas wyniki również dowodzą, że nukleotydy, a zwłaszcza ich tiofosforanowe analogi mają istotny wpływ na ilość wydzielanego z komórek czynnika wzrostu śródbłónka naczyniowego. Jest to szczególnie istotne z uwagi na fakt, że wysokie stężenie glukozy, jakie panuje w ranie cukrzycowej, obniża produkcję VEGF, co wykazano między innymi na przykładzie ludzkich keratynocytów [Jazwa *et al.*, 2006]. Nasze badania z udziałem keratynocytów linii HaCaT dowiodły, że spośród analizowanych związków najsilniejszą stymulację produkcji VEGF-A

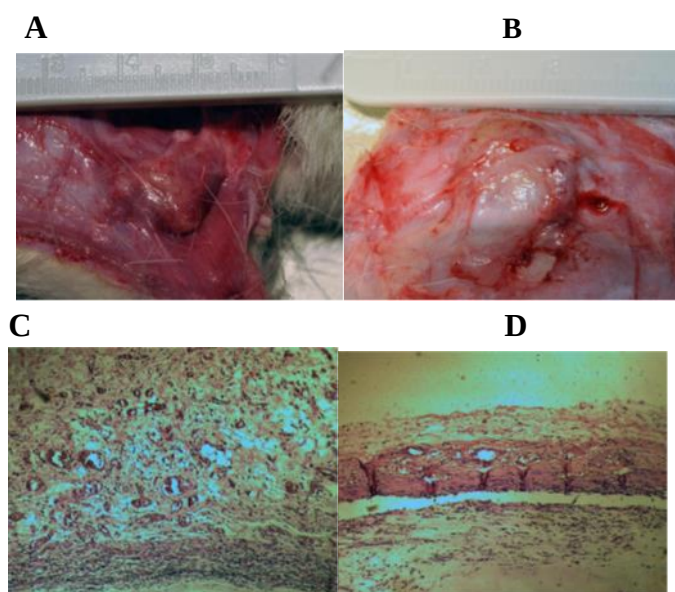
wywołał nie tylko analizowany już wcześniej pod tym kątem ATP γ S, ale także UTP, a zwłaszcza jego tiofosforanowe analogi, UTP α S i UTP γ S. W warunkach hiperglikemicznych stymulacja po inkubacji z tymi związkami była nawet silniejsza w porównaniu z warunkami standardowymi.

Innym ważnym aspektem aktywności zewnątrzkomórkowych nukleotydów opisanym w pracy H-7 jest ich wpływ na proces migracji komórek HaCaT. Zdolność migracji keratynocytów i fibroblastów do środowiska rany z sąsiednich obszarów również decyduje o powodzeniu procesu gojenia. Stopień migracji komórek określano za pomocą testu zarastania rasy wykonanej w monowarstwie rosnących komórek. Metoda ta określana jest także jako test gojenia *in vitro*. Spośród analizowanych nukleotydów ATP γ S i UTP γ S najsilniej zwiększały stopień migracji keratynocytów, przy czym efekt stymulacyjny utrzymywał się także w wysokim stężeniu glukozy.

W toku realizacji projektów „Synteza i badania biologiczne nowych ligandów receptorów nukleotydowych stymulujących proces gojenia ran. Identyfikacja mechanizmu molekularnego” oraz „Tiofosforanowe analogi nukleotydów pirymidynowych jako wielofunkcyjne ligandy receptorów P2Y₆ i P2Y₁₄ w warunkach hiperglikemii” jedną z najbardziej istotnych obserwacji było stwierdzenie stymulacji przeżywalności i migracji komórek, jak również stymulacji sekrecji czynnika VEGF przez 5'-O-monotiofosforany nukleozydów. Na szczególną uwagę zasługuje aktywność TMPS, UMPS, CMPS i AMPS, które stymulowały zarówno przeżywalność, jak i proliferację keratynocytów linii HaCaT, szczególnie w warunkach hiperglikemicznych. Związki te stymulowały też wydzielanie VEGF-A przez keratynocyty linii HaCaT, jak również fibroblasty HDF w warunkach prawidłowego stężenia glukozy. W warunkach hiperglikemicznych ich aktywność była nieco mniejsza, ale również wywoływały istotne statystycznie zmiany ilości produkowanego proangiogenego białka. Niemodyfikowane monofosforany nukleozydów nie wywoływały takich efektów. Obserwacje to potwierdzały hipotezę, że 5'-O-monotiofosforany nukleozydów mogą stanowić ligandy receptorów nukleotydowych P2Y. Hipoteza ta została przeze mnie udowodniona, co będzie omówione szerzej w następnym podrozdziale [H-8 i H-9].

Ze względu na zaobserwowanie unikatowych potencjalnie proangiogennych właściwości 5'-O-monotiofosforanów nukleozydów w następnym etapie pracy postanowiłam zbadać wpływ wyselekcjonowanego nukleotydu (5'-O-monotiofosforan tymidyny) na aktywację procesu angiogenezy *in vivo* (ocena makroskopowa i histopatologiczna). W tym celu nawiązałam współpracę z dr Bartłomiejem Grobelskim, pełniącym funkcję kierownika Zwierzętarń Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, gdzie zostały

przeprowadzone wszystkie eksperymenty z udziałem zwierząt doświadczalnych (szczury). Jako nośnik nukleotydów została zastosowana bionanoceluloza wytwarzana w Instytucie Biochemii Technicznej PŁ jako preparat opatrunkowy. Grupy doświadczalne poddane były procedurze wszczepienia w kieszonki podskórne preparatu BNC poprzez nacięcie skóry o długości około 1 cm, a następnie dokładne zszywanie brzegów rany. Po 30 dniach od momentu implantacji preparaty bionanocelulozy zostały wyjęte w celu wykonania analizy makroskopowej i histopatologicznej. We wszystkich przypadkach rany powstałe po nacięciu skóry nie posiadały cech zapalnych oraz ropnych, a gojenie rany przebiegało w sposób prawidłowy. Krążki BNC wypreparowane z kieszonek podskórnych po 30 dniach od implantacji, po uprzednim utrwaleniu w 10% formalinie zostały zatopione w parafinie, a następnie z blozków parafinowych wykonywano skrawki barwione hematoksyliną i eozyną. Analiza histopatologiczna preparatu celulozy bakteryjnej nasączonej roztworem TMPS (0,7 mg/krążek) wykazała silne unaczynienie oraz brak ostrego odczynu zapalnego. Dla porównania w preparacie kontrolnym obserwowano jedynie nieliczne naczynia krwionośne (Rys. 2). Zastosowany jako nukleotyd kontrolny difosforan urydyny wykazywał znikomą aktywność proangiogenną. W preparatach z zaadsorbowanym na powierzchni UDP pojawiły się jedynie bardzo nieliczne drobne naczynia krwionośne, przy czym również nie obserwowano odczynu zapalnego (*Dane niepublikowane, prezentowane przeze mnie podczas wykładu na zaproszenie na IV Congress of Polish Biotechnology and “IV EUROBIOTECH 2011” Central European Congress of Life Sciences („Modified nucleotides in treatment of wound healing”; październik 2011, Kraków).*



Rysunek 2. Bionanoceluloza nasączona roztworem TMPS w ilości 0,7 mg (A, C) oraz preparat kontrolny (B, D) 30 dni po wszczepieniu w kieszonki podskórne szczura oraz analiza histopatologiczna skrawków barwionych hematoksyliną i eozyną.

Zostały również podjęte próby oceny wpływu TMPS na przyspieszenie gojenia ran u szczurów, przy zastosowaniu modelu przewlekłego gojenia rany. W celu wygenerowania takiego modelu została zastosowana mitomycyna C – związek przeciwnowotworowy wyizolowany ze *Streptomyces caespitosus*, którego rola polegała na powstrzymaniu naturalnej proliferacji fibroblastów, keratynocytów i komórek nabłonka (Murakami et al., 2010). Wygenerowane rany zostały pokryte krążkami bionanocelulozy o średnicy około 1 cm. Jeden krążek został nasączony roztworem TMPS, a drugi stanowił kontrolę. Procedura zmiany opatrunku była powtarzana u każdego zwierzęcia dwa razy w tygodniu. Określone punkty czasowe wybrano w celu oceny tempa regeneracji skóry (mierzonej jako średnica rany) pod wpływem opatrunku celulozowego zawierającego 5'-O-monotiofosforan tymidyny, jak również opatrunku kontrolnego. Niestety, zastosowany model przewlekłego gojenia ran okazał się mieć duże ograniczenia podczas badania wpływu TMPS zaadsorbowanego na opatrunku celulozowym. Po pierwsze, zmiana opatrunku celulozowego powinna mieć miejsce co 24 godziny w celu uniknięcia nadmiernego wysuszania krążków celulozy i integracji z raną, co jednak wydaje się niemożliwe w przypadku szczurzego modelu doświadczalnego (opatrunek był przymocowywany pojedynczymi szwami za pomocą nici chirurgicznych po uprzednim uśpieniu poprzez domięśniowe podanie ketaminy i ksylazyny). Być może opatrunek wykonany z innego materiału niż BNC byłby do tego celu bardziej przydatny. Po drugie, procedura oczyszczania ran z fragmentów tkanki martwiczej powodowała stymulację prawidłowego procesu gojenia, co potwierdzone zostało zarówno w obrazie klinicznym rany, jak i w analizie histopatologicznej. Ze względu na większą ilość ran oczyszczanych w pierwszych dniach trwania eksperymentu w grupie kontrolnej, w późniejszych punktach czasowych udział ran martwiczych został zmieniony na niekorzyść opatrunku zawierającego TMPS. Można więc wyciągnąć wniosek, że w przypadku tego typu badań procedura oczyszczania ran nie powinna zostać wprowadzona, pomimo wysokiego ryzyka ogólnoustrojowych powikłań. Mając na uwadze ograniczenia zastosowanego w trakcie realizacji projektu modelu, w kolejnym etapie badań chciałabym rozważyć wykorzystanie szczurów ZDF (Zucker Diabetic Fatty) będących powszechnie stosowanym modelem doświadczalnym cukrzycy typu 2 z otyłością.

Innym projektem, w którym postanowiłam wykorzystać potencjał tiofosforanowych pochodnych nukleotydów, jest określenie roli nukleozidotiofosforanów jako czynników promujących proces zasiedlania implantów wykonanych z bionanocelulozy przez chondrocyty. Uszkodzenie tkanki chrzęstnej (np. łąkotki) jest jednym z najczęściej występujących urazów [Fox et al., 2015]. Rozwiązaniem może być w takim przypadku przeszczep allograficzny lub zastosowanie implantów wytworzonych z różnego typu

biomateriałów, stanowiących rusztowanie dla proliferujących komórek. Dla otrzymania implantu kluczowe jest wytworzenie struktury przestrzennej, w której chondrocyty równomiernie zasiedlą powierzchnię BNC, jak również wnikną głębiej. Celem prowadzonych pod moim kierunkiem badań jest między innymi wykorzystanie czynników, które mogą stymulować proces migracji chondrocytów. Przeprowadzone badania wykazały, że związkami stymulującymi migrację komórek mogą być właśnie tiofosforanowe analogi nukleotydów [H-8, H-9]. Tematyka ta jest realizowana przez mgr inż. Marcina Szustaka, którego opiekunem naukowym jestem od roku 2013. Promotorem rozprawy doktorskiej „Wpływ pochodnych nukleotydów na fenotyp oraz migrację ludzkich chondrocytów łąkotki rosnących *in vitro* na powierzchni bionanocelulozy” jest prof. dr hab. Stanisław Bielecki.

Wymieniony powyżej kierunek badań ma na celu nie tylko wyjaśnienie molekularnych podstaw aktywności tiofosforanowych analogów nukleotydów. Określenie przydatności wytwarzanej na drodze biotechnologicznej bionanocelulozy jako rusztowania do odbudowy uszkodzonej chrząstki wraz z oceną przydatności tiofosforanowych ligandów receptorów nukleotydowych w procesie zasiedlania biomateriału chondrocytami ma charakter typowo aplikacyjny i wpisuje się w interdyscyplinarny nurt badań wykorzystujący zdobycze biotechnologii w medycynie regeneracyjnej.

C.3 Identyfikacja mechanizmu molekularnego odpowiedzialnego za aktywność biologiczną 5'-O-monotiofosforanów nukleozydów (identyfikacja receptora nukleotydowego) [H-8 i H-9]

- **5'-O-monotiofosforany nukleozydów jako agoniści receptorów P2Y**

Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań wskazują, że nie tylko di- i trifosforany nukleozydów, ale również 5'-O-monotiofosforany nukleozydów mogą stanowić ligandy receptorów nukleotydowych. Jedną z metod identyfikacji ligandów receptorów GPCR jest określenie ich wpływu na wtórne przekazywanie sygnału komórkowego, w tym mobilizację wewnątrzkomórkowych zasobów wapnia. Przyłączenie agonisty do wielu receptorów klasy P2Y powoduje zmianę konformacji receptora, co pozwala na oddziaływanie z heterotrimerycznym białkiem G po stronie wewnątrzkomórkowej i zapoczątkowanie szeregu odpowiedzi komórkowych. W przypadku białek Gq powstający trifosforan inozytolu (IP₃) otwiera IP₃-zależny kanał wapniowy siateczki śródplazmatycznej, w następstwie czego ma miejsce uwalnianie jonów Ca²⁺ do cytoplazmy i zwiększenie ich stężenia.

We wstępnych badaniach wykorzystano komórki śródbłónka HUVEC w celu wykazania możliwości mobilizacji wewnątrzkomórkowych zasobów jonów wapnia w

odpowiedzi na UDP, który stanowi agonistę receptorów P2Y₆ oraz P2Y₁₄, jak również pod wpływem TMPS, który nie był wcześniej w literaturze rozważany jako ligand receptorów z rodziny P2Y. Analizy z zastosowaniem wapnioczułego barwnika fluorescencyjnego Fluo-8 wykazały, że dodanie 5'-O-monotiofosforanu tymidyny powoduje wzrost stężenia jonów wapnia w cytoplazmie komórek HUVEC, co stanowi dowód na aktywację przez TMPS receptora sprzężonego najprawdopodobniej z białkiem Gq.

Ze względu na możliwość aktywacji receptorów nukleotydowych P2Y w komórkach HUVEC podjęto próbę bezpośredniej identyfikacji konkretnych białek receptorowych, dla których ligandami mogą być 5'-O-monotiofosforany nukleozydów. W tym celu konieczne było dysponowanie linią komórkową z ekspresją pojedynczego receptora P2Y. Ze względu na trudności z uzyskaniem nadekspresji pojedynczych receptorów nukleotydowych, podjęłam decyzję o wysłaniu 5'-O-monotiofosforanów nukleozydów do dwóch firm oferujących odpłatną analizę właściwości agonistycznych i antagonistycznych potencjalnych ligandów receptorów P2Y. Pierwsza z firm, GenScript Corporation, przeprowadziła analizy, z zastosowaniem komórek gwiazdki 1321N1 ze stabilną ekspresją receptorów P2Y₁-P2Y₁₂, natomiast w drugiej, Multispan Inc., z wykorzystaniem tych samych komórek, analizowano aktywację receptorów P2Y₆, P2Y₁₁ i P2Y₁₃. Firma Multispan Inc. przeprowadziła także analizę aktywacji receptora P2Y₁₄ eksprymowanego w ludzkich komórkach embrionalnych nerki linii HEK293T (ang. *Human Embryonic Kidney*). Okazało się, że TMPS posiada aktywność agonisty receptora P2Y₆ nie wykazując takich właściwości w stosunku do innych receptorów P2Y. Jedynie P2Y₁₁ i P2Y₁₄ w bardzo niewielkim i nieistotnym pod względem statystycznym stopniu ulegały aktywacji pod wpływem TMPS. Wyniki uzyskane w wykorzystaniu komórek ze stabilną ekspresją receptorów P2Y są zgodne z wynikami badań funkcjonalnych uzyskanymi w naszym zespole, które dowodzą, że wyciszenie genu receptora P2Y₆ znosi efekt stymulacji migracji komórek wywołany przez TMPS [Gendaszewska-Darmach i Szustak, 2016; H-8]. Warto nadmienić, że artykuł H-8 został uznany przez „Global Medical Discovery”, czasopismo i portal prezentujący kluczowe osiągnięcia w zrozumieniu chorób człowieka, za pracę o naukowo istotnym znaczeniu (<https://globalmedicaldiscovery.com/category/key-scientific-articles/> (marzec 2016)).

Wszystkie analizowane pirymidynowe 5'-O-monotiofosforany nukleozydów (TMPS, UMPS, CMPS) okazały się agonistami receptora P2Y₆, przy czym największą mobilizację jonów wapnia wywoływał UMPS. Analiza ta stanowi dowód na to, że nie tylko UDP czy jego tiofosforanowy analog UDPβS, lecz 5'-O-monotiofosforany nukleozydów pirymidynowych działają jako ligandy receptora P2Y₆. Aktywności takiej nie wykazują 5'-O-

monotiofosforany nukleozydów purynowych (np. AMPS), a także niemodyfikowane 5'-O-monofosforany nukleozydów pirymidynowych (UMP).

5'-O-monotiofosforany nukleozydów, z wyjątkiem TMPS, nie wykazują specyficzności w stosunku do pojedynczego receptora P2Y. AMPS posiada np. aktywność agonisty receptora P2Y₁₁, którego natywnym ligandem jest ATP, a UMPS, CMPS i AMPS aktywują receptor P2Y₁₄, którego naturalnym agonistą jest UDP-glukoza. Najmniej specyficznym spośród badanych receptorów okazał się właśnie P2Y₁₄, którego naturalnym ligandem jest UDP-glukoza. Ulegał on aktywacji nie tylko pod wpływem 5'-O-monotiofosforanów nukleozydów pirymidynowych (UMPS, CMPS), ale także pod wpływem niemodyfikowanego UMP oraz AMPS. Największą aktywność spośród badanych związków wykazał UMPS, który był także najsilniejszym agonistą P2Y₆.

Unikatowy wpływ 5'-O-monotiofosforanu tymidyny jako agonisty tylko jednego receptora wśród receptorów nukleotydowych P2Y (receptora P2Y₆) został również potwierdzony poprzez analizę stymulującego wpływu tego nukleotydu na migrację komórek HeLa z wykorzystaniem zjawiska interferencji RNA oraz z zastosowaniem selektywnego antagonisty receptora P2Y₆ MRS 2578 (1,1'-(butan-1,4-dylo)bis[3-(3-izotiotyocyanianofenyl)tiomocznik]. Zwiększona stabilność TMPS w porównaniu z niemodyfikowanymi nukleotydami, jak również jego powinowactwo do receptora P2Y₆ mogą być odpowiedzialne za wywoływane efekty długoterminowe takie jak migracja komórek.

- **5'-O-monotiofosforan tymidyny jako antagonist receptor P2Y₁₄**

Podczas analizy pomiaru mobilizacji wewnątrzkomórkowych zasobów jonów wapnia z wykorzystaniem komórek HEK293T wykazujących stabilną ekspresję receptora P2Y₁₄ wykazano także unikatowe antagonistyczne działanie 5'-O-monotiofosforan tymidyny. Okazało się, że TMPS hamuje wyrzut jonów wapnia wywołany przez UDP-glukozę (UDPG), która jest endogennym agonistą P2Y₁₄. Warto w tym miejscu zaznaczyć, że pre-inkubacja z pozostałymi analizowanymi 5'-O-monotiofosforanami nukleozydów (AMPS, UMPS, CMPS) również skutkowała zmniejszoną odpowiedzią komórek HEK293T na obecność UDPG. Spadek ten był jednak najprawdopodobniej spowodowany zjawiskiem desensytyzacji receptora P2Y₁₄ wywołanym przez AMPS, UMPS i CMPS, które działają jako jego agoniści. Desensytyzacja receptorów GPCR występuje podczas wystawienia ich na działanie agonisty lub antagonisty, a mechanizmy leżące u podstaw tego zjawiska obejmują m. in. odłączenie receptora od białka G lub internalizację receptora [Zizzo i wsp., 2012].

Stwierdzony przeze mnie antagonizm 5'-O-monotiofosforanu tymidyny w stosunku do receptora P2Y₁₄ jest zupełnie nowym odkryciem i może przyczynić się do znalezienia nowych, skuteczniejszych struktur antagonistów tego receptora. Nikt wcześniej nie opisał aktywności TMPS jako antagonisty/agonisty jakiegokolwiek receptora nukleotydowego. Antagonizm TMPS wobec P2Y₁₄ jest niezwykle istotny, gdyż receptor ten reguluje m. in. aktywność komórek tucznych (mastocytów), odgrywających kluczową rolę w inicjowaniu reakcji nadwrażliwości typu I leżącej u podstaw procesów alergicznych, a także stanów zapalnych. Charakterystyczną cechą morfologiczną mastocytów jest obecność licznych ziarnistości w cytoplazmie, w których gromadzone są mediatory o szerokim spektrum działania (np. histamina, serotonina, tryptaza, leukotrieny) [Molderings, 2010]. Naturalnym i najczęstszym mechanizmem aktywującym komórki tuczne jest pobudzenie receptora o wysokim powinowactwie do immunoglobulin klasy IgE (FcεRI). Związanie antygeny (alergenu) przez połączone z receptorem FcεRI przeciwciała IgE prowadzi do degranulacji komórek, czyli gwałtownego uwolnienia zawartości ziarnistości [Gilfillan i Tkaczyk, 2006], a na proces ten może wpływać także aktywacja innych receptorów obecnych w błonie komórkowej mastocytów, w tym receptora P2Y₁₄ [Gao *et al.*, 2013]. Możliwość modyfikowania odpowiedzi komórek tucznych poprzez receptory nukleotydowe stwarza więc nowy cel dla terapii nadwrażliwości typu I. Ligandy tych receptorów, a zwłaszcza selektywni antagoniści, mogą stać się podstawą leków antyalergicznym nowej generacji. Zahamowanie zjawiska degranulacji komórek tucznych wydzielających liczne mediatory odpowiedzi zapalnej jest także związane z poszukiwaniami nowych związków chemicznych działających jako stymulatory trudno gojących się ran.

Biorąc pod uwagę stwierdzone antagonistyczne działanie 5'-O-monotiofosforanu tymidyny, postanowiłam sprawdzić wpływ tego nukleotydu na aktywację komórek tucznych na drodze zależnej od receptora FcεRI. Jako model komórek tucznych została wykorzystana szeroko stosowana w badaniach immunologicznych linia komórkowa RBL-2H3 charakteryzująca się wysoką ekspresją receptora FcεRI (500 000 cząsteczek/komórkę) [Passante *et al.*, 2009]. Linia ta została wykorzystana w przeprowadzonych przez nas badaniach również dlatego, że istnieją dane literaturowe potwierdzające wysoką ekspresję receptora P2Y₁₄ w tych komórkach [Gao *et al.*, 2010].

W wyniku przeprowadzonych badań zaobserwowano między innymi stymulację mobilizacji wewnątrzkomórkowych jonów wapnia w komórkach RBL-2H3 nie tylko pod wpływem UDP-glukozy, ale także 5'-O-monotiofosforanów nukleozydów. UMPS i AMPS wywołują wzrost stężenia jonów wapnia w komórkach tucznych RBL-2H3. Słabszą aktywację wywoływały również CMPS oraz UMP. Niewielki wzrost stężenia Ca²⁺

zaobserwowano także pod wpływem dodania TMPS. Uzyskany wynik świadczy o istnieniu na powierzchni komórek RBL-2H3 receptorów aktywowanych przez 5'-O-monotiofosforany nukleozydów. Jednak najbardziej istotną obserwacją było stwierdzenie zahamowania wzrostu stężenia Ca^{2+} stymulowanego przez selektywnego agonistę receptora P2Y₁₄ MRS 2690 (difosforan 1-(α -D-glukopiranozylo)-2-(2'-tiourydyn-5''-ylowy)) pod wpływem 5'-O-monotiofosforanu tymidyny. Wynik ten potwierdza antagonistyczne właściwości TMPS i obserwacje uzyskane wcześniej na linii komórkowej HEK293T ze stabilną ekspresją receptora P2Y₁₄.

Właściwości antagonistyczne 5'-tiofosforanu tymidyny wobec receptora P2Y₁₄ zostały także potwierdzone w teście funkcjonalnym degranulacji komórek tucznych linii RBL-2H3. Zastosowany pomiar ilości uwolnionej β -heksoaminidazy (β -HEX, enzymu uwalnianego równocześnie z histaminą), jest podstawową metodą badawczą pozwalającą ocenić stopień aktywacji i degranulacji komórek tucznych. Zgodnie z oczekiwaniami, UDP-glukoza znacznie zwiększała uwalnianie β -heksoaminidazy, podobnie jak UDP, UMP, UMPS, CMPS i AMPS. Jedynym wyjątkiem okazał się być 5'-tiofosforan tymidyny. Co więcej, TMPS powodował zniesienie stymulacji degranulacji wywołanej przez UDP-glukozę oraz selektywnego agonistę receptora P2Y₁₄, a mianowicie MRS 2690. Test ten stanowi kolejny dowód na unikatowe wśród 5'-O-monotiofosforanów nukleozydów antagonistyczne działanie 5'-O-monotiofosforanu tymidyny względem receptora P2Y₁₄.

Podsumowując, spośród 5'-O-monotiofosforanów nukleozydów TMPS okazał się być antagonistą receptora P2Y₁₄, w przeciwieństwie do UMPS, CMPS, a nawet AMPS. Możliwą przyczyną utraty aktywności agonistycznej przez TMPS jest to, że związek ten pozbawiony jest grupy hydroksylowej w pozycji 2'. Obecność grup hydroksylowych w pozycjach 2' i 3' w cząsteczce rybozy została zidentyfikowana przez Trujillo i wsp. jako element strukturalny niezbędny do aktywacji receptora P2Y₁₄. Seria deoksyrybonukleotydów nie jest bowiem w stanie utworzyć wszystkich koniecznych interakcji z udziałem wiązań wodorowych, które są obserwowane w rybonukleotydach [Trujillo et al., 2015]. Dlatego, aby potwierdzić tę sugestię, porównałam wpływ dwóch tiofosforanowych analogów zawierających adeninę. Okazało się, że dAMPS, w przeciwieństwie do AMPS, hamuje wywołaną przez UDP-glukozę degranulację komórek RBL-2H3.

Blokowanie receptora P2Y₁₄ jest korzystne ze względu na jego udział w uwalnianiu przez komórki tuczne mediatorów stanów zapalnych, co pozwala stworzyć lepsze warunki dla prawidłowego przebiegu procesu gojenia. Jednocześnie, zdolność do aktywacji receptora P2Y₆ przez TMPS i prawdopodobny udział w stymulacji sekrecji czynnika VEGF-A są

unikatowe wśród ligandów P2Y pod kątem dwukierunkowej pozytywnej regulacji przebiegu procesu gojenia.

C.4 1-O-acylo-2-O-metylo-3-O-fosfodiesterowe i 1-O-acylo-2-O-metylo-3-O-tiofosforanowe analogi lizofosfolipidów: zależne od struktury funkcje biologiczne

Modyfikacje tiofosforanowe cząsteczek będących ligandami receptorów GPCR okazały się istotne nie tylko w przypadku nukleotydowych agonistów/antagonistów receptorów klasy P2Y, ale również dla otrzymania zupełnie nowej grupy związków należących do lizofosfolipidów (LPL). Obecnie wiadomo, że lizofosfolipidy, posiadające tylko jedną resztę kwasu tłuszczowego związaną ze szkieletem glicerolowym, należą obok nukleotydów, do grupy cząsteczek sygnałowych i w ten sposób mogą regulować szereg ważnych procesów fizjologicznych i patofizjologicznych. Wyniki najnowszych badań wskazują, iż LPL są związane z etiologią takich chorób, jak: nowotwory, cukrzyca, otyłość i miażdżyca. Podczas gdy historia badań nad receptorami nukleotydowymi rozpoczęła się ponad 40 lat temu, istnienie białek receptorowych aktywowanych przez lizofosfolipidy odkryto dopiero w połowie lat 90-tych ubiegłego stulecia. Mimo że obecność lizofosfatydylocholiny (LPC) w osoczu odnotowano już na początku XX wieku [Kihara *et al.*, 2015], dopiero w roku 1996 zidentyfikowano pierwszy receptor GPCR rozpoznawany przez kwas lizofosfatydowy (LPA), określony później wg nomenklatury Międzynarodowej Unii Farmakologicznej jako LPA1 [Hecht *et al.*, 1996]. Kwas lizofosfatydowy należy też do lizofosfolipidów o najlepiej poznanej funkcji. Zaliczany jest do tzw. fosfolipidowych czynników wzrostu, regulując m.in. proliferację i migrację komórek, a także stymulując procesy karcynogenezy i angiogenezy. Stężenie LPA w surowicy krwi zależy od poziomu i aktywności lizofosfolipazy D (autotaksyny, ATX), która hydrolizuje lizofosfatydylocholiny z uwolnieniem LPA i choliny [Tsuda *et al.*, 2006]. Rozwój metod analitycznych, przede wszystkim spektrometrii mas, doprowadził w ciągu ostatniej dekady do identyfikacji innych lizofosfolipidów o potencjalnym znaczeniu fizjologicznym. W warunkach *in vivo*, oprócz LPA i LPC, występują m.in. lizofosfatydyloinozytol (LPI), lizofosfatydyloseryna (LPS), lizofosfatydyloetanolamina (LPE) oraz lizofosfatydylotreonina (LPT) [Makide *et al.*, 2009]. Różnorodność struktur związków lizofosfolipidowych odzwierciedla różnorodność ich funkcji w żywych organizmach, a głównym odkryciem w dziedzinie biologii LPL w ostatniej dekadzie jest to, że ich funkcje fizjologiczne są związane z aktywacją specyficznych receptorów błonowych komórki. Jednak wiedza dotycząca aktywowanych przez LPL

receptorów oraz szlaków sygnałowych jest nadal fragmentaryczna, a wnioski wynikające z pewnych badań – wręcz kontrowersyjne.

Dzięki wcześniejszym doświadczeniom w syntezie i badaniu aktywności biologicznych tiofosforanowych analogów nukleotydów, szybko stało się dla mnie jasne, że tiofosforanowe analogi LPL mogą być bardzo wartościowym narzędziem w badaniach funkcji i celów biologicznych wybranych lizofosfolipidów. Jako biolog molekularny (z wykształcenia) i doktor nauk chemicznych zdawałam sobie sprawę, jak zaprojektować wstępne badania nad tiofosforanowymi analogami LPL, aby zdefiniować możliwości ich zastosowania w dalszych badaniach. Jednym z kluczowych problemów, które należało brać pod uwagę jest charakterystyczny kształt cząsteczek lizofosfolipidów w postaci stożka (pojedynczy łańcuch węglowy i duża grupa polarna). Taka struktura nadaje im właściwości zbliżone do detergentów mogące być przyczyną destrukcji błon biologicznych. Szczególną uwagę należało więc poświęcić badaniom cytotoksyczności i włączyć do warsztatu badawczego większą pulę testów w porównaniu z analizą cytotoksyczności nukleotydów. Przykładem może być pomiar uwalniania przez komórki dehydrogenazy mleczanowej (LDH) wskazujący na stopień zaburzenia integralności błony komórkowej.

W roku 2007 rozpoczęliśmy realizację zadania „Synteza i aktywność biologiczna tiofosforanowych i ditiofosforanowych analogów lizofosfolipidów” w granie zamawianym PBZ-MNiSW-07/I/2007 pt. ”Biofosforany i oligonukleotydy oraz ich kongenery jako diagnostyki i leki nowej generacji” finansowanym przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (koordynator prof. dr hab. Barbara Nawrot). W/w zadaniem kierowała prof. Maria Koziołkiewicz, a ja wraz z prof. Okruszkiem pełniliśmy rolę głównych wykonawców. Brałam także aktywny udział w przygotowywaniu w/w wniosku grantowego. W ramach realizacji projektu zsyntetyzowano serię analogów kwasu lizofosfatydowego, cyklicznego kwasu fosfatydowego i lizofosfatydylocholiny, zawierających w pozycji *sn*-1 glicerolu resztę kwasu tłuszczowego (12:0, 14:0, 16:0, 18:0 albo 18:1), w pozycji *sn*-2 grupę metoksyłową zapobiegającą migracji reszt acylowych, a w pozycji *sn*-3 - resztę tiofosforanową lub ditiofosforanową, w której jeden lub dwa z niemostrkowych atomów tlenu zostały zastąpione atomem (atomami) siarki. Na podstawie naszych wcześniejszych obserwacji dotyczących stabilności tiofosforanowych analogów nukleotydów, zakładaliśmy, że modyfikowane pochodne LPL będą także bardziej odporne na działanie enzymów hydrolitycznych. Trzeba jednak dodać, że w chwili rozpoczęcia naszych badań nad tiofosforanowymi analogami lizofosfolipidów, wiedza na temat ich stabilności metabolicznej, enzymów odpowiedzialnych za degradację oraz aktywowanych przez nie receptorów była bardziej skąpa w porównaniu z

wiedzą, jaką dysponowaliśmy o analogach nukleotydowych w chwili rozpoczęcia badań nad ich aktywnością wobec receptorów błonowych.

- **Określenie wpływu 1-O-acylo-2-O-metylo-3-O-fosfodiesterowych i 1-O-acylo-2-O-metylo-3-O-tiofosforanowych analogów kwasu lizofosfatydowego, cyklicznego kwasu fosfatydowego i lizofosfatydylocholina na aktywność autotaksyny [H-3]**

Stężenie kwasu lizofosfatydowego w surowicy krwi zależy od poziomu i aktywności lizofosfolipazy D (autotaksyny, ATX). Enzym ten, na podstawie podobieństwa sekwencji aminokwasowej, zakwalifikowano do rodziny wspomnianych już wcześniej nukleotydowych pirofosfataz/fosfodiesteraz i określono jako NPP2 [Goding *et al.*, 2003]. Mimo zakwalifikowania autotaksyny do rodziny białek NPP obecnie wiadomo, że podstawowa rola tego enzymu związana jest z produkcją LPA i aktywnością ATX jako lizofosfolipazy D, przy czym głównym, prawdopodobnie najbardziej preferowanym substratem dla ATX jest w warunkach *in vivo* lizofosfatydylocholina. Wykorzystując LPC jako substrat, ATX katalizuje też reakcję transfosfatydylacji z utworzeniem cyklicznego kwasu fosfatydowego (cPA) o odmiennych aktywnościach biologicznych w stosunku do LPA [Tsuda *et al.*, 2006].

Autotaksyna jest obecnie uważana za jeden z głównych czynników odpowiedzialnych za rozwój i zdolność ekspansji wielu typów nowotworów. Z tego względu poszukiwanie inhibitorów autotaksyny jest obecnie jedną ze strategii poszukiwania nowych leków przeciwnowotworowych [Saunders *et al.*, 2008]. Kluczowe znaczenie ma fakt, że ATX jest białkiem sekrecyjnym wydzielanym do osocza, a więc jej potencjalne inhibitory nie muszą wnikać do komórek za pośrednictwem złożonych systemów transportujących. Zastosowanie inhibitorów autotaksyny (przede wszystkim z grupy analogów LPA i cPA ze względu na ujemne sprzężenie zwrotne regulujące aktywność enzymatyczną ATX) powinno nie tylko zahamować proliferację samych komórek nowotworowych, ale także ograniczyć proces angiogenezy i limfangiogenezy, które odgrywają istotną rolę w przerzutowaniu. Potencjalny inhibitor autotaksyny, obok specyficzności, powinien charakteryzować się także stabilnością metaboliczną. *In vivo*, katabolizm LPA jest katalizowany przez trzy grupy enzymów: fosfatazy lizofosfolipidowe LPP, acylotransferazy kwasu lizofosfatydowego LPAAT oraz lizofosfolipazy LPL [Gendaszewska-Darmach, 2008]. Fosfatazy lizofosfolipidowe LPP katalizują defosforylację LPA, w wyniku której zostaje uwolniona grupa fosforanowa i powstaje monoacyloglicerol. Innym szlakiem prowadzącym do zmniejszenia puli LPA jest estryfikacja katalizowana przez specyficzne acylotransferazy LPAAT, co prowadzi do powstania kwasu fosfatydowego z dwoma grupami acylowymi. Natomiast specyficzne lizofosfolipazy LPL hydrolizują wiązanie estrowe uwalniając z cząsteczek LPA łańcuch

kwasu tłuszczowego. Ponadto w cząsteczce LPA może mieć miejsce nieenzymatyczna migracja reszty kwasu tłuszczowego między pozycjami *sn*-1 i *sn*-2 [Prestwich *et al.*, 2005]. Z tego powodu w Instytucie Biochemii Technicznej PŁ została podjęta synteza tiofosforanowych i/lub ditiofosforanowych analogów LPA, cPA oraz LPC zestryfikowanych resztami nasyconych (12:0, 14:0, 16:0, 18:0) oraz nienasyconych (18:1) kwasów tłuszczowych, które jak przypuszczaliśmy, będą bardziej odporne na działanie w/w enzymów. Dodatkowo w pozycję *sn*-2 syntetyzowanych analogów wprowadzono grupę metoksyłową (2-OMe), w celu zwiększenia stabilizacji struktury tych związków. W tym czasie jedynym opisanym w literaturze tiofosforanowym analogiem LPA był 1-oleoilo-2-metoksyglicerolo-tiofosforan (ang. 1-oleoyl-2-O-methyl-rac-glycerophosphothioate, OMPT) [Hasegawa *et al.*, 2003].

Podjęte przeze mnie badania biologiczne miały na celu analizę stabilności zsyntetyzowanych w naszym zespole analogów LPA, cPA i LPC oraz zostały ukierunkowane na poszukiwanie skutecznych inhibitorów autotaksyny. Analizę wpływu LPL na aktywność autotaksyny przeprowadzono z zastosowaniem zestawu „Autotaxin Inhibitor Screening Kit” firmy Echelon Biosciences Inc. oraz wyznaczono wartości IC_{50} dla każdego z badanych związków. W zastosowanym teście fluorescencyjny substrat ATX, będący analogiem LPC z przyłączoną kowalencyjnie fluoresceiną oraz barwnikiem tłumiącym fluorescencję ulega rozszczepieniu pod wpływem ludzkiej autotaksyny, co powoduje emisję fluorescencji. Pozytywną kontrolę inhibitora w stosowanym teście stanowił α -bromometylenofosfonianowy analog LPA (BrP-LPA), znany z silnych właściwości inhibicyjnych w stosunku do ATX [Prestwich *et al.*, 2008].

W pracy “The chemical synthesis of metabolically stabilized 2-OMe-LPA analogues and preliminary studies of their inhibitory activity toward autotaxin” [Bioorg Med Chem Lett., 22(8): 2698-2700 (2012), H-3] wykazano, że kilka spośród zsyntetyzowanych w naszym zespole analogów lizofosfolipidów wykazuje obiecujące właściwości w teście hamowania aktywności autotaksyny. Najsilniejsze właściwości inhibicyjne wykazuje analog LPA z łańcuchem kwasu oleinowego (18:1) w pozycji *sn*-1 i grupą metoksyłową w pozycji *sn*-2 i w porównaniu z niemodyfikowanym oleoilo-LPA, jest on silniejszym inhibitorem ATX. Wartość IC_{50} dla tego analogu wynosi 220.2 ± 36.0 nM, która to wartość jest zbliżona do IC_{50} BrP-LPA, stanowiącego w teście związek kontrolny. Porównując preferencje ATX w stosunku do długości (12:0, 14:0, 16:0, 18:0) i stopnia nienasycenia (18:0 vs 18:1) przyłączonych kwasów tłuszczowych, można wyciągnąć wniosek, że najslabszymi inhibitorami są związki zawierające lauryłowe i stearyłowe łańcuchy acylowe. Taka sama preferencja była widoczna w przypadku 1-O-acylo-2-O-metylo-3-O-fosfodiestrowych i 1-O-

acylo-2-O-metylo-3-O-tiofosforanowych analogów LPA, gdzie zaobserwowano tendencję, że wraz ze wzrostem długości łańcucha kwasu tłuszczowego wzrastają właściwości inhibitorowe związku. Wprowadzenie grupy tiofosforanowej do analogów LPA nie zmieniło zasadniczo ich właściwości inhibitorowych.

W przypadku cyklicznych kwasów fosfatydowych wartości IC_{50} można było wyznaczyć jedynie dla niemodyfikowanych związków, wśród których większy potencjał inhibicyjny wykazywały również związki z długimi łańcuchami kwasów tłuszczowych: kwasu oleinowego i stearynowego. Były one jednak słabszymi inhibitorami ATX w porównaniu z analogami LPA. Dla tio- i ditiofosforanowych analogów cPA (z wyjątkiem oleoilotio-cPA) nie wyznaczono IC_{50} , gdyż nie mieściło się ono w zakresie badanych stężeń (do 10 μ M). Poddane analizie tiofosforanowe analogi LPC z gr. metoksyłową w pozycji *sn*-2 nie wykazywały znaczących właściwości inhibicyjnych wobec ATX. W tej grupie najniższe IC_{50} , przekraczające jednak wartość 2 μ M, uzyskano dla 1-oleoilo-2-metoksy-tio-LPC. Ze względu na wysokie wartości lub niemożność wyznaczenia parametru IC_{50} dane dotyczące analogów cPA i LPC nie zostały włączone do pracy H-3.

Charakterystyka zależności pomiędzy strukturą lizofosfolipidowych analogów (reszta acylowa, modyfikacja szkieletu glicerolowego za pomocą grupy metylowej i grupy fosforanowej za pomocą atomów siarki) a właściwościami inhibitorowymi w stosunku do autotaksyny stanowi istotny wkład w obecny stan wiedzy na temat zależności między strukturą a aktywnością inhibitorów ATX. Fakt ten może mieć istotne znaczenie dla poszukiwań nowych analogów lizofosfolipidów o właściwościach przeciwnowotworowych.

W omawianej publikacji H-3 podjęto też porównawcze analizy stabilności LPA oraz ich analogów w obecności alkalicznej fosfatazy. Enzym ten katalizuje defosforylację fosforanowych monoestrów i wykazuje maksymalną aktywność w środowisku zasadowym. Co ciekawe, enzymy NPP, w tym autotaksyna, należą do superrodziny alkalicznych fosfataz, przy czym NPP preferencyjnie katalizują hydrolizę fosforanowych diestrów [Zalatan *et al.*, 2006]. Zarówno białka NPP, jak i alkaliczna fosfataza, biorą udział w wielu procesach komórkowych, takich jak: migracja komórek i mineralizacja kości [Stefan *et al.*, 2005]. A więc alkaliczna fosfataza obecna w określonych typach komórek może katalizować degradację LPA podawanych w celach terapeutycznych. Analizie stabilności w obecności alkalicznej fosfatazy poddano m.in. niemodyfikowany oleoilo-LPA (18:1) oraz analogi z grupą metoksyłową w pozycji *sn*-2. Pierwszy z nich uległ degradacji w czasie 24 godzin inkubacji w obecności fosfatazy alkalicznej. Analogi z grupą metoksyłową okazały się bardziej stabilne. W zależności od długości i stopnia nasycenia łańcucha kwasu tłuszczowego obecnego w pozycji *sn*-1, analogi 2-OMe-LPA wykazywały częściową lub całkowitą

stabilność. W każdym przypadku obecność grupy metoksyłowej w pozycji *sn*-2 wpływa jednak na zwiększenie stabilności badanych związków.

Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują, że najbardziej znaczącą inhibicję działania ATX wykazuje 1-O-oleilo-2-OMe-LPA, który jednocześnie jest także odporny na działanie alkalicznej fosfatazy, co czyni go najlepszym kandydatem jako inhibitora autotaksyny.

• **1-O-acylo-2-O-metylo-3-O-fosfodiestrowe i 1-O-acylo-2-O-metylo-3-O-tiofosforanowe analogi lizofosfatydylocholiny jako modulatory aktywności komórek β trzustki [H-4, H-5, H-6]**

W 2010 roku, wraz z zakończeniem zadania nt. „Synteza i aktywność biologiczna tiofosforanowych i ditiofosforanowych analogów lizofosfolipidów” w granie zamawianym PBZ-MNiSW-07/I/2007 pt. ”Biofosforany i oligonukleotydy oraz ich kongenery jako diagnostyki i leki nowej generacji” stało się dla nas jasne, że nie tylko LPA jest zaangażowany w regulację procesów komórkowych (prolifracja i migracja komórek oraz angiogeneza), ale także inne lizofosfolipidy, jak np. lizofosfatydylocholina, która według kilku raportów miała być ligandem kluczowego dla sekrecji insuliny receptora GPR119 [Soga *et al.*, 2005] i modulować szlaki sygnałowe związane z cukrzycą typu 2 [Yea *et al.*, 2009]. Była to dla nas istotna informacja, ponieważ Zespół Biotechnologii Żywności i Nutrigenomiki, kierowany przez prof. Koziółkiewicz interesuje się podłożem molekularnym chorób dieto-zależnych, w tym cukrzycy.

Kamieniem milowym w ukierunkowaniu moich zainteresowań badawczych w stosunku do konkretnych lizofosfolipidów oraz aktywowanych przez nie receptorów było pojawienie się w literaturze informacji, że lizofosfatydylocholina w sposób bezpośredni aktywuje proces wydzielania insuliny przez komórki trzustki i metabolizm glukozy [Soga *et al.*, 2005]. Celem moich badań stało się od tej pory potwierdzenie hipotezy o możliwości aktywowania receptorów GPCR eksprymowanych w komórkach β , zlokalizowanych w wyspkach Langerhansa trzustki, które są odpowiedzialne za sekrecję insuliny – hormonu regulującego stężenie glukozy we krwi, również przez tiofosforanowe analogi LPC ze ściśle zdefiniowanymi resztami kwasów tłuszczowych. Z jednej strony rozszerzyliśmy nasze zainteresowania na inne lizofosfolipidy i ich analogi, przygotowując kolejny projekt zatytułowany „Chemiczna synteza 1-O-acylo-2-O-metylo-3-O-fosfodiestrowych oraz 1-O-acylo-2-O-metylo-3-O-tiofosforanowych analogów wybranych lizofosfolipidów (lizofosfatydylocholina, lizofosfatydyloinozytol, lizofosfatydyloetanolamina)”, z drugiej zaś

moje zainteresowania badawcze skryształizowały się na próbie potwierdzenia aktywacji receptorów GPCR przez tiofosforanowe analogi LPL.

Obserwowany od początku roku 2000 dynamiczny postęp w identyfikacji kolejnych receptorów aktywowanych przez różne strukturalnie LPL rozpoczął nową erę badań nad lizofosfolipidami, których nie traktowano już jako związków pełniących jedynie funkcje strukturalne i energetyczne, ale jako cząsteczki sygnałowe [Hla *et al.*, 2001]. Jednak zjawisko aktywacji receptorów błonowych przez lizofosfolipidy jest niezwykle złożone ze względu na mnogość potencjalnych ligandów, liczbę zidentyfikowanych dotąd receptorów, ich zróżnicowaną specyficzność oraz możliwe niespecyficzne oddziaływania lizofosfolipidów z błoną komórkową. Co więcej, najnowsze dane literaturowe wskazują, że LPL mają możliwość oddziaływania z tzw. receptorami sierocymi (np. GPR55, GPR35), których endogenne ligandy oraz funkcje biologiczne nie zostały dotychczas należycie zdefiniowane.

Otyłość i cukrzyca typu 2 to jeden z największych problemów zdrowotnych współczesnego świata. Według danych Międzynarodowej Federacji Diabetologicznej na cukrzycę choruje obecnie ponad 59,8 mln ludzi w Europie i ponad 2,2 mln w Polsce (dane z roku 2015). Niestety, dostępne metody terapeutyczne nie są skuteczne i bezpieczne, co wskazuje na konieczność opracowania nowych strategii terapeutycznych, które poprawią sytuację zdrowotną oraz społeczno-ekonomiczną w skali globalnej. Cukrzyca jest wielonarządowym schorzeniem metabolicznym, charakteryzującym się przewlekłą hiperglikemią z zaburzeniami metabolizmu węglowodanów i lipidów na skutek defektu wydzielania i/lub działania insuliny [Hirsova *et al.*, 2016]. Narastająca insulinooporność tkanek i towarzysząca jej hiperglikemia wraz z niewydolnością komórek β trzustki znacząco przyczyniają się do rozwoju cukrzycy typu 2, która jest 10 razy bardziej rozpowszechniona niż cukrzyca typu 1 [Jung i Choi, 2014]. Najnowsze dane wskazują, iż lizofosfatydylocholina w sposób bezpośredni aktywuje proces wydzielania insuliny przez komórki trzustki i metabolizm glukozy. Obniża także poziom glukozy we krwi myszy z cukrzycą typu 1 i 2 [Yea *et al.*, 2009]. Jednak molekularny mechanizm odpowiedzialny za ten efekt nie został jeszcze poznany. Z drugiej strony, wykazano, iż oleoil-LPC aktywuje receptor błonowy GPR119, występujący na powierzchni komórek trzustki; jego aktywacja prowadzi do zwiększonego uwalniania insuliny. Zarówno badania *in vitro* jak i badania na zwierzętach wskazują, że modulowanie aktywności receptora GPR119 może mieć wpływ na funkcje komórek trzustki, poziom glukozy, wagę ciała, itp. [Overton *et al.*, 2006]. W 2011 r. pojawiły się pierwsze informacje na temat kolejnego receptora aktywowanego przez lizofosfolipidy (w tym przypadku lizofosfatydyloinozytol) i eksprymowanego przez komórki β trzustki –

GPR55, który również okazał się związany z modulacją sekrecji insuliny [Romero-Zerbo *et al.*, 2011].

Ze względu na fakt, iż nasze wcześniejsze badania wskazywały na zależność aktywności lizofosfolipidów od rodzaju reszty acylowej związanej z glicerolem, zaplanowaliśmy syntezę tiofosforanowych i fosfodiestrowych analogów lizofosfatydylocholiny zestryfikowanych resztami nasyconych (12:0, 14:0, 16:0, 18:0) oraz nienasyconych (18:1) kwasów tłuszczowych w pozycji *sn-1* jako nowych modulatorów receptorów GPR119/GPR55 oraz zbadanie mechanizmu ich działania. Naszym celem było porównanie właściwości biologicznych niemodyfikowanych cząsteczek LPC oraz odpowiednich analogów pod kątem ich zdolności do regulacji wydzielania hormonów trzustkowych (insuliny i glukagonu) oraz zbadanie odpowiedzialnych za ten efekt mechanizmów molekularnych. Jako modele komórkowe w badaniach *in vitro* wykorzystano linię mysich komórek β TC-3 (model komórek β trzustki). Badania te były możliwe dzięki uzyskaniu w 2011 roku finansowania wspomnianego wyżej projektu OPUS kierowanego przez prof. dr hab. Andrzeja Okruszka („Chemiczna synteza 1-O-acylo-2-O-metylo-3-O-fosfodiestrowych oraz 1-O-acylo-2-O-metylo-3-O-tiofosforanowych analogów wybranych lizofosfolipidów (lizofosfatydylocholina, lizofosfatydyloinozytol, lizofosfatydyloetanolamina) i wstępne badania ich aktywności biologicznej”; 2011/01/B/ST5/06383) oraz w roku 2013 projektu PRELUDIUM („Porównawcza ocena skuteczności tiofosforanowych i fosfodiestrowych analogów lizofosfatydylocholiny w regulacji gospodarki węglowodanowej i aktywności wobec nowych receptorów związanych z cukrzycą: badania *in vitro*”; 2013/11/N/NZ5/00270) kierowanego przez mgr inż. Annę Drzazgę. W projekcie OPUS pełniłam rolę głównego wykonawcy odpowiedzialnego za realizację zadań biologicznych, a także uczestniczyłam w przygotowywaniu wniosku grantowego. W roku 2011 rozpoczęłam opiekę naukową nad doktorantką mgr inż. Anną Drzazgą, której stałam się wkrótce promotorem pomocniczym. Rozprawa doktorska mgr inż. Anny Drzazgi, zatytułowana „Badanie aktywności biologicznej 1-O-acylo-2-O-metylo-3-O-fosfodiestrowych oraz 1-O-acylo-2-O-metylo-3-O-tiofosforanowych analogów lizofosfatydylocholiny” jest realizowana pod kierunkiem prof. dr hab. Marii Koziółkiewicz.

Wykonane analizy wykazały, że różnice w strukturze analogów LPC wynikające zarówno z obecności atomów siarki i reszty metylowej, jak i różnych reszt acylowych, mają wpływ na obserwowaną aktywność biologiczną. Wykazaliśmy, że tiofosforanowe i ditiofosforanowe analogi LPC, użyte w stężeniu do 10 μ M, cechuje znikoma toksyczność względem badanego modelu komórkowego (mysie komórki linii β TC-3) zarówno w podłożu zawierającym surowicę, jak i medium bez jej zawartości. Znaczące działanie cytotoksyczne w

podłożu hodowlanym pozbawionym surowicy obserwowano w przypadku niemodyfikowanych cząsteczek LPC, zwłaszcza 14:0, 16:0 i 18:0. Wprowadzenie jednego atomu siarki do grupy fosforanowej znacząco zmniejszyło cytotoksyczność badanych związków. W badaniach nad aktywnością biologiczną lizofosfolipidów skład podłoża hodowlanego, a w szczególności obecność lub brak surowicy, również ma duże znaczenie. Albumina surowicza, która jest głównym białkiem surowicy, wykazuje bardzo duże powinowactwo do lizofosfolipidów i wolnych kwasów tłuszczowych i tym samym decyduje o stężeniu wolnych form LPL w surowicy krwi, a więc i o efektywności działania. Tym samym wyniki uzyskane w różnych warunkach hodowli komórek mogą być odmienne. Zawartość surowicy w podłożu hodowlanym może spowodować znaczne obniżenie obserwowanej aktywności biologicznej lizofosfolipidów m.in. przez akumulację części z nich przez zawartą w surowicy albuminę [Kim *et al.*, 2009].

Z uwagi na charakterystyczną strukturę lizofosfolipidów nadającą im właściwości zbliżone do detergentów, badanie cytotoksyczności analogów LPC przeprowadzono również za pomocą testu na wydzielanie wewnątrzkomórkowej dehydrogenazy mleczanowej (LDH). W eksperymencie enzym ten ma charakter markera uszkodzeń błony komórkowej. W przypadku wszystkich badanych analogów LPC zastosowanych w stężeniu 10 μM , uszkodzenie błony komórkowej nie przekroczyło 5% próby kontrolnej. Otrzymane wyniki pozwalają na stwierdzenie, że wszystkie analogi LPC objęte projektem nie są toksyczne wobec modelu mysich komórek β w stężeniu 10 μM , co uzasadnia dalsze badania ich aktywności. Należy jednak podkreślić, że 10 μM to sugerowana dawka bezpośrednio oddziałująca na badane komórki i powinna ona ulec zwiększeniu w zależności od środowiska, w którym prowadzone jest oznaczenie. Otrzymane wyniki zostały opublikowane w roku 2013 (“The chemical synthesis and cytotoxicity of new sulfur analogues of 2-methoxy-lysophosphatidylcholine”. *Bioorg Med Chem Lett.*, 23 (24): 6794-6798; H-5)

W toku kolejnych analiz stwierdzono, że analogi LPC mają zdolność do stymulacji mobilizacji wewnątrzkomórkowych zasobów jonów wapnia. Ze względu na wspomniane wcześniej detergentowe właściwości lizofosfolipidów kontrolne oznaczenie wykonano poprzez jednoczesne dodanie do środowiska komórkowego jodku propidyny (PI), który ma zdolność do interkalacji w DNA badanych komórek, jeżeli podczas eksperymentu doszło do ich uszkodzenia [Mokhatari *et al.* 2008]. Wprowadzenie tej zmiany umożliwiło monitorowanie stanu modelu komórkowego w czasie rzeczywistym. Podczas gdy LPC zestryfikowane resztą kwasu palmitynowego (16:0) oraz mirystynowego (14:0) powodowały wyrzut wewnątrzkomórkowych jonów wapnia przy jednoczesnym zwiększeniu stopnia permeabilizacji błony komórkowej, LPC zestryfikowane resztą kwasu laurynowego (12:0)

oraz naturalna LPC 18:0 stymulowały mobilizację jonów bez naruszenia struktury dwuwarstwy fosfolipidowej. Ponadto przebieg wyrzutu jonów wapnia zarejestrowany po stymulacji komórek β TC-3 za pomocą LPC 18:0 wyróżnia się na tle pozostałych sygnałów, co sugeruje prawdopodobnie inny mechanizm molekularny odpowiedzialny za odpowiedź komórkową w porównaniu z pozostałymi aktywnymi związkami. Ciekawą obserwacją jest też fakt, że żaden związek spośród różniących się resztą acylową serii analogów ditiofosforanowych nie stymulował odpowiedzi komórkowej w postaci mobilizacji wewnątrzkomórkowych jonów wapnia. W naszych badaniach jedyną serią LPC, która nie wywoływała wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia, były związki zawierające resztę kwasu oleinowego.

Podjęto również próbę scharakteryzowania mechanizmów komórkowych odpowiedzialnych za zaobserwowany wyrzut wapnia w modelu komórek β TC-3. W tym celu zastosowano nitrendypinę, hamującą wnikanie jonów wapniowych poprzez kanały potencjałozależne (VDCC, ang. Voltage-Dependent Calcium Channels), NiCl_2 blokujący niespecyficzny dokońrkowy napływ jonów wapnia oraz EDTA (kwas wersenowy) chelatujący jony dwuwartościowe i ograniczający pozakomórkowe źródła wapnia. Otrzymane wyniki wskazują, że w przypadku cząsteczek LPC 12:0 (zarówno niemodyfikowanych, jak również zawierających funkcję tiofosforanową) wzrost stężenia wewnątrzkomórkowych jonów wapnia jest spowodowany w większości poprzez ich napływ ze środowiska zewnątrzkomórkowego. Odwrotną sytuację zaobserwowaliśmy w przypadku LPC z przyłączonym łańcuchem kwasu mirystynowego, gdzie zdecydowanie przeważał udział wewnątrzkomórkowych szlaków sygnalizacyjnych. Z kolei LPC zawierające resztę kwasu palmitynowego wykazywały różną aktywność w zależności od obecności lub braku atomu siarki, przy czym obecność grupy tiofosforanowej przyczyniała się do większego udziału kanałów VDCC. Obserwowane zmiany w $[\text{Ca}^{2+}]_i$ w odpowiedzi na obecność niemodyfikowanej formy LPC 18:0 są natomiast rezultatem jednoczesnej aktywacji kanałów VDCC oraz wewnątrzkomórkowej mobilizacji jonów wapnia. Zróżnicowane podłoże molekularne odpowiedzialne za wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} w zależności od związku stymulującego zostało opisane w publikacji „Sulfur- and acyl chain-dependent influence of 2-methoxy-lysophosphatidylcholine analogues on β pancreatic cells” [*Curr Top Med Chem.* 15(23): 2395-2405 (2015); H-6].

W kontekście aktywacji receptorów GPR119 i GPR55 oraz mechanizmów molekularnych regulujących gospodarkę węglowodanową organizmu, nasze badania nad niemodyfikowanymi cząsteczkami LPC oraz ich 1-O-acylo-2-O-metylo-3-O-fosfodiestrowymi i 1-O-acylo-2-O-metylo-3-O-tiofosforanowymi pochodnymi obejmują

obecnie nie tylko analizy mobilizacji wewnątrzkomórkowych jonów Ca^{2+} , ale także innych przekaźników, w tym cAMP. Jednak podstawowe znaczenie dla selekcji najaktywniejszych lizofosfolipidów ma oznaczanie poziomu insuliny wydzielanej przez komórki trzustki w warunkach wysokiego stężenia glukozy (ang. Glucose-Stimulated Insulin Secretion; GSIS). Niestety, pracując z mysim modelem komórkowym $\beta\text{TC-3}$, napotkaliśmy w tym obszarze badań problemy metodyczne. Mimo wielokrotnych prób oznaczenia poziomu sekrecji insuliny przez te komórki, nie odnieśliśmy na tym polu sukcesu (poziom insuliny był zbyt niski, aby można było oznaczyć jej ilość za pomocą dostępnych testów ELISA). Dlatego podjęliśmy współpracę z prof. Peterem Bergstenem (kierownik pracowni Zespołu Biologii Komórek β -trzustkowych; Biomedical Centre Uniwersytetu Uppsala w Szwecji) celem przeprowadzenia oznaczenia stymulacji sekrecji insuliny przez badane analogi LPC na stabilnej linii komórkowej β – MIN6, która jest często wykorzystywana do tego typu badań [Ning *et al.* 2008], jednak nie jest dostępna komercyjnie. Wyniki oznaczeń przeprowadzonych w ramach stażu w laboratorium prof. Bergstena przez mgr inż. Annę Drzazgę potwierdziły wcześniejsze przypuszczenia o zróżnicowanej aktywności biologicznej analogów LPC oraz ich zdolności do wzmożonej stymulacji sekrecji insuliny w porównaniu z ich naturalnymi odpowiednikami. Tiofosforanowe analogi lizofosfatydylocholiny stymulują modelowe komórki trzustki do wyrzutu insuliny silniej niż ich naturalne prekursory. Po wykonaniu dodatkowych analiz (m.in. poziomu ekspresji genów *gpr119* i *gpr55*) stało się jasne, że obserwowane przez nasz różnice w odpowiedzi dwóch modelowych linii komórek β trzustki wynikają najprawdopodobniej z odmiennych profili ekspresji wymienionych genów. Wyniki badań uzyskanych we współpracy z zespołem prof. Petera Bergstena są przedmiotem przygotowywanego manuskryptu publikacji.

Zdobyta w ostatnim okresie wiedza oraz doświadczenie w zakresie nauk biologicznych i chemicznych skłoniły mnie do poszukiwania nowych rozwiązań dla wyjaśnienia molekularnych mechanizmów działania lizofosfolipidów oraz ich plejotropowego efektu. W chwili obecnej rozszerzyliśmy badania poświęcone aktywności biologicznej lizofosfatydylocholiny oraz jej analogów tiofosforanowych i fosfodiestrowych na inne modele komórkowe. Poza komórkami β trzustki, pracujemy między innymi z komórkami α trzustki (mysia linia komórek $\alpha\text{-TC1}$) badając poziom wydzielanego przez nie glukagonu. W celu uzyskania jak najpełniejszego obrazu procesów patofizjologicznych mających miejsce w przypadku cukrzycy, określamy także wpływ analogów LPC na różnicowanie preadipocytów (mysia linia 3T3 L1) do dojrzałych komórek tłuszczowych, czyli na przebieg adipogenezy.

W celu wyjaśnienia roli cząsteczek LPC, które za pośrednictwem receptorów GPR119 i/lub GPR55 uczestniczą w regulacji metabolizmu lipidów i węglowodanów włączyliśmy do

naszych badań zsyntetyzowane w Instytucie Biochemii Technicznej fosfodiesterowe i tiofosforanowe analogi lizofosfatydyloetanolaminy (LPE). Decyzja o zastosowaniu w naszych badaniach LPE i jej analogów wynika z faktu, iż są to związki podobne strukturalnie do LPC, obecne w komórkach i płynach ustrojowych, ale ich aktywności biologiczne nie zostały dotąd zidentyfikowane. Porównanie aktywności analogów LPC i LPE z ze zdefiniowaną resztą kwasu tłuszczowego pozwoli także określić wpływ polarnej „głowy” cząsteczek tych związków. Już pierwsze obserwacje, wskazują na odmienną aktywność (cytotoksyczność) obydwu klas cząsteczek i prawdopodobnie aktywację odmiennych białek receptorowych (szczegóły opisane w pracy „The chemical synthesis and preliminary biological studies of phosphodiester and phosphorothioate analogues of 2-methoxylysophosphatidylethanolamine”. *Bioorg Med Chem Lett.* 26(15): 3725-9 (2016); praca nie została włączona w cykl publikacji będących podstawą wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego)

Zaplanowaliśmy także modelowanie molekularnych oddziaływań badanych LPL z receptorami GPR119 i GPR555. W tym celu nawiązaliśmy współpracę z prof. dr hab. Piotrem Panethem (Międzyresortowy Instytut Techniki Radiacyjnej Politechniki Łódzkiej) w celu przeprowadzenia modelowania matematycznego interakcji naturalnych LPC oraz ich syntetycznych analogów z receptorami błonowymi GPR119 i GPR55 z wykorzystaniem baz oraz oprogramowania do modelowania homologicznego, co pozwoli na szczegółowe wyjaśnienie podstaw obserwowanego zróżnicowania efektu działania. Odnoszenie wyników badań biologicznych do modeli uzyskanych na drodze obliczeń jest coraz częściej stosowanym podejściem badawczym. Jest to również forma rozwiązania problemu braku dostępnych struktur krystalograficznych receptorów błonowych, w przypadku których izolacja białka jest szczególnie kłopotliwa. Dotychczas nie zdeponowano struktur GPR55 i GPR119 ani żadnego z receptorów o zbliżonej homologii strukturalnej. Ukazało się natomiast wiele prac prezentujących matematyczne modele oddziaływań ligandów z receptorami o potencjalnym znaczeniu terapeutycznym w przypadku chorób nowotworowych (Kotsikorou *et al.* 2013), co wskazuje na duże i ciągle rosnące znaczenie obliczeniowych metod badawczych. Mamy nadzieję, że zastosowanie metod modelowania molekularnego wraz z korelacją z wynikami doświadczeń biologicznych pozwoli określić kluczowe składniki struktury niezbędne do oddziaływań niemodyfikowanych związków (LPC i LPE) i ich modyfikowanych analogów z receptorami GPR119 i GPR55.

Podsumowując, moje najbliższe plany naukowe będą stanowić kontynuację realizowanych obecnie przeze mnie badań aktywności biologicznej lizofosfolipidów i ich tiofosforanowych analogów, a także identyfikacji oddziaływań z receptorami GPCR (np.

GPR119, GPR55, ale nie wykluczam też innych obiektów). W kontekście opublikowanych w sierpniu b.r. doniesień literaturowych dotyczących receptora GPR119 [Hassing *et al.*, 2016] szczególnie interesujące wydaje się być zjawisko tzw. selektywności funkcjonalnej ligandów (ang. *biased signalling*), czyli występowania różnej aktywności wewnętrznej badanego związku, w odniesieniu do poszczególnych wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych. Wielopłaszczyznowa analiza różnych szlaków sygnałowych pozwala na pełniejsze scharakteryzowanie badanych związków i umożliwia wyjaśnienie różnic w ich aktywności. Mam nadzieję, że interdyscyplinarne podejście do tych problemów, czyli wykorzystanie wyników modelowania molekularnego, wykorzystanie zróżnicowanych strukturalnie lizofosfolipidów, jak również chemiczna synteza odpowiednich enancjomerów pozwoli ująć ten problem wielowątkowo i przyczynić się do poszerzenia wiedzy na temat przyczyn chorób dieto-zależnych. Te dynamicznie rozwijające się kierunki badań w połączeniu z potencjałem badawczym zespołów naukowych Instytutu Biochemii Technicznej zajmujących się Biotechnologią Molekularną, Biomateriałami, Biokatalizą, Biologią Strukturalną, Biotechnologią Żywności i Nutrigenomiką mogą stanowić punkt wyjścia do projektowania nowych sposobów ich leczenia i projektowania nowych wyrobów medycznych niezbędnych w medycynie transplantacyjnej i regeneracyjnej.

W toku realizacji wspomnianych projektów powstała również publikacja przeglądowa, napisana przeze mnie z udziałem mgr inż. Anny Grzelczyk (obecnie dr inż. Anna Ciesielska) [“Novel bioactive glycerol-based lysophospholipids: new data - new insight into their function. *Biochimie*, 95(4): 667-679 (2013); H-4] i poświęcona lizofosfolipidom, a w szczególności lizofosfatydylocholinie, lizofosfatydyloinozytolowi, lizofosfatydyloetanolaminie, lizofosfatydyloserynie, lizofosfatydylotreoninie i lizofosfatydyloglicerolowi. Artykuł ten koncentruje się na biosyntezie, dystrybucji i aktywnościach biologicznych w/w LPL. Szczególny nacisk został położony na zidentyfikowane dotychczas receptory błonowe aktywowane przez poszczególne lizofosfolipidy oraz na rolę opisywanych związków jako cząsteczek sygnałowych. Dyskutowany jest również wpływ LPL na zmiany organizacji błon komórkowych.

C.5 Charakterystyka osiągnięcia naukowego

Charakterystyka prezentowanego przeze mnie osiągnięcia naukowego będącego podstawą do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego jest ściśle skorelowana z charakterystycznymi cechami mojej ścieżki naukowej. Jestem z wykształcenia biologiem molekularnym, posiadającym stopień doktora nauk chemicznych w zakresie chemii

bioorganicznej. Dlatego niezwykle cenię możliwość współpracy z zespołami chemików syntetyków i widzę ogromne możliwości wynikające z tak ścisłej współpracy. Obiektem prowadzonych przeze mnie badań stały się syntetyczne tiofosforanowe analogi nukleotydów i lizofosfolipidów, które jak wykazałam, posiadają unikatowe właściwości biologiczne i stanowią zarazem doskonałe narzędzia badawcze. Moje wykształcenie biologa molekularnego pozwala mi przewidywać i analizować udział takich związków w modulowaniu aktywności wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych, czego efektem są zmiany ilościowe i jakościowe w procesach proliferacji i migracji komórek oraz śmierci komórkowej, jak również zmiany ekspresji określonych białek i enzymów. Wyniki moich badań mogą być wykorzystane w interdyscyplinarnych zespołach badawczych zajmujących się zagadnieniami nanobiotechnologicznymi i opartymi o nutrigenomikę.

W toku realizacji rozprawy habilitacyjnej:

1. Określono wpływ enzymów degradujących nukleotydy oraz składu podłoża hodowlanego dla komórek HeLa i HUVEC na stabilność zewnątrzkomórkowych nukleotydów i ich tiofosforanowych analogów [H-1]
2. Wyselekcjonowano pulę tiofosforanowych analogów nukleotydów, które wydają się być dobrymi kandydatami do dalszych analiz *in vivo* w kontekście leczenia trudno gojących się ran cukrzycowych [H-2, H-7]
3. Zidentyfikowano receptory nukleotydowe, których ligandami są 5'-O-monotiofosforany nukleozydów [H-8 i H-9]
4. Określono wpływ 1-O-acylo-2-O-metylo-3-O-fosfodiestrowych i 1-O-acylo-2-O-metylo-3-O-tiofosforanowych analogów kwasu lizofosfatydowego, cyklicznego kwasu fosfatydowego i lizofosfatydylocholiny na aktywność autotaksyny [H-3]
5. Wskazano możliwe drogi modulacji aktywności komórek β trzustki przez 1-O-acylo-2-O-metylo-3-O-fosfodiestrowe i 1-O-acylo-2-O-metylo-3-O-tiofosforanowe analogi lizofosfatydylocholiny [H-4, H-5, H-6].

Piśmiennictwo:

- Bambace NM, Levis JE, Holmes CE. The effect of P2Y-mediated platelet activation on the release of VEGF and endostatin from platelets. *Platelets* 21(2): 85-93 (2010)
- Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, Golinko MS, Ehrlich HP, Brem H. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *J Surg Res* 153(2): 347-58 (2009)
- Bles N, Horckmans M, Lefort A, Libert F, Macours P, Housni H, Marteau F, Boeynaems JM, Communi D. Gene expression profiling defines ATP as a key regulator of human dendritic cell functions. *J Immunol* 179(6): 3550-8 (2007)
- Bunstock G. Purinergic receptors. *J Theor Biol* 62: 491-503 (1976)

- Burnstock G. Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*; 22: 364–73 (2002)
- Burnstock G. Pathophysiology and Therapeutic Potential of Purinergic Signaling. *Pharmacol Rev* 58(1): 58-86 (2006)
- Czaja WK, Krystynowicz A, Bielecki S., Brown RM Jr. Microbial cellulose-the natural power to heal wounds, *Biomaterials* 27, 145-151 (2006)
- Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Dubyak GR, Harden TK, Jacobson KA, Schwabe U, Williams M. Towards a revised nomenclature for P1 and P2 receptors. *Trends Pharmacol Sci* 18: 79-82 (1997)
- Fox AJS, Wanivenhaus F, Burge AJ, Warren RF, Rodeo SA. The Human Meniscus: A review of anatomy, function, injury, and advances in treatment. *Clin Anat.*;28:269–287 (2015).
- Gama M, Dourado F, Bielecki S (red). Bacterial Nanocellulose. From Biotechnology to Bio-Economy. Wyd. Elsevier (2016).
- Gao ZG, Ding Y, Jacobson KA. UDP-glucose acting at P2Y₁₄ receptors is a mediator of mast cell degranulation. *Biochemical pharmacology.* 79:873-879 (2010)
- Gao ZG, Wei Q, Jayasekara MP, Jacobson KA. The role of P2Y₁₄ and other P2Y receptors in degranulation of human LAD2 mast cells. *Purinergic signalling.* 9:31-40 (2013)
- Gendaszewska-Darmach E. Lysophosphatidic acids, cyclic phosphatidic acids and autotaxin as promising targets in therapies of cancer and other diseases. *Acta Biochim Pol.* 55(2): 227-304 (2008)
- Gijsbers R, Ceulemans H, Stalmans W, Bollen M. Structural and catalytic similarities between nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase and alkaline phosphatase. *J Biol Chem.*; 276: 1361–8 (2001)
- Goding J.W., Grobben B., Slegers H. Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochim. Biophys. Acta* 1638: 1-19 (2003)
- Gurtner G.C., Werner S., Barrandon Y., Longaker M.T. Wound repair and regeneration, *Nature* 453, 314-321 (2008)
- Hasegawa Y, Erickson JR, Goddard GJ, Yu S, Liu S, Cheng KW, Eder A, Bandoh K, Aoki J, Jarosz R, Schrier AD, Lynch KR, Mills GB, Fang X. Identification of a phosphothionate analogue of lysophosphatidic acid (LPA) as a selective agonist of the LPA₃ receptor. *J Biol Chem.* 278(14):11962-9 (2003)
- Hassing HA, Fares S, Larsen O, Pad H, Hauge M, Jones RM, Schwartz TW, Hansen HS, Rosenkilde MM. Biased signaling of lipids and allosteric actions of synthetic molecules for GPR119. *Biochem Pharmacol.* pii: S0006-2952(16)30236-2 (2016)
- Hecht JH, Weiner JA, Post SR, Chun J. Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex. *The Journal of cell biology.* 135:1071–1083 (1996)
- Hla T., Lee M. J., Ancellin N., Paik J. K., Kluk M. J. Lysophospholipids-receptor revelations. *Science* 294: 1875-8 (2001)
- Jazwa A., Loboda A., Golda S., Cisowski J., Szelag M., Zagorska A., Sroczynska P., Drukala J., Jozkowicz A., Dulak J., Effect of heme and heme oxygenase-1 on vascular endothelial growth factor synthesis and angiogenic potency of human keratinocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 40 1250-63 (2006)
- Jin H, Seo J, Eun SY, Joo YN, Park SW, Lee JH, Chang KC, Kim HJ. P2Y₂ R activation by nucleotides promotes skin wound-healing process. *Exp Dermatol* 23(7): 480-5 (2014)
- Jung UJ, Choi MS. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci.* 15(4):6184-223 (2014)
- Kihara Y, Mizuno H, Chun J. Lysophospholipid receptors in drug discovery. *Exp Cell Res.* 333(2):171-7 (2015)
- Kim YL, Im YJ, Ha NC, Im DS. Albumin inhibits cytotoxic activity of lysophosphatidylcholine by direct binding. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* ;83(1-2):130-8 (2007)
- Hirsova P, Ibrahim SH, Gores GJ, Malhi H. Lipotoxic lethal and sublethal stress signaling in hepatocytes: relevance to NASH pathogenesis. *J Lipid Res.* pii: jlr.R066357 (2016)
- Kotsikorou E1, Sharir H, Shore DM, Hurst DP, Lynch DL, Madrigal KE, Heynen-Genel S, Milan LB, Chung TD, Seltzman HH, Bai Y, Caron MG, Barak LS, Croatt MP, Abood ME, Reggio PH. Identification of the GPR55 antagonist binding site using a novel set of high-potency GPR55 selective ligands. *Biochemistry* 52(52):9456-69 (2013)

- Makide K, Kitamura H, Sato Y, Okutani M, Aoki J. Emerging lysophospholipid mediators: lysophosphatidylserine, lysophosphatidylthreonine, lysophosphatidylethanolamine and lysophosphatidylglycerol. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* 89,135–139 (2009)
- Mokhtari D, Myers JW, Welsh N. MAPK kinase kinase-1 is essential for cytokine-induced c-JunNH2-terminal kinase and nuclear factor-kappaB activation in human pancreatic islet cells. *Diabetes*.2008;57(7):1896-904
- Molderings GJ. Mast cell function in physiology and pathophysiology. *BIOTREND Reviews* No.5, (2010)
- Murakami K., Ishihara M., Aoki H., Nakamura S., Nakamura S., Yanagibayashi S., Takikawa M., Kishimoto S., Yokoe H., Kiyosawa T., Sato Y. Enhanced healing of mitomycin C-treated healing-impaired wounds in rats with hydrosheets composed of chitin/chitosan, fucoidan, and alginate as wound dressings. *Wound Repair Regen.* 18:478-85 (2010)
- Ning, Y.; O'Neill, K.; Lan, H.; Pang, L.; Shan, L.X.; Hawes, B.E.; Hedrick, J.A. Endogenous and synthetic agonists of GPR119 differ in signalling pathways and their effects on insulin secretion in MIN6c4 insulinoma cells. *Br. J. Pharmacol.*, 155(7), 1056-1065 (2009)
- Papanas N, Maltezos E Growth factors in the treatment of diabetic foot ulcers: new technologies, any promises? *Int J Low Extrem Wounds* 6: 37–53 (2007)
- Prestwich GD, Xu Y, Qian L, Gajewiak J, Jiang G. New metabolically stabilized analogues of lysophosphatidic acid: agonists, antagonists and enzyme inhibitors. *Biochem. Soc. Trans.* 33: 1357- 1361 (2005)
- Romero-Zerbo SY et al. A role for the putative cannabinoid receptor GPR55 in the islets of Langerhans. *J Endocrinol.* 211(2):177-85 (2011)
- Saunders LP, Ouellette A, Bandle R, Chang WC, Zhou H, Misra R.N, De La Cruz EM, Braddock DT. Identification of small-molecule inhibitors of autotaxin that inhibit melanoma cell migration and invasion. *Mol. Cancer Ther.* 7: 3352-3362 (2008)
- Schaeffer G., Levak-Frank S., Spitaler M.M., Fleischhacker E., Esenabhalu V.E., Wagner A.H., Hecker M., Graier W.F., Intercellular signalling within vascular cells under high D-glucose involves free radical-triggered tyrosine kinase activation. *Diabetologia* 46 773-83 (2003).
- Sharma A., Singh A.K., Warren J., Thangapazham R.L., Maheshwari R.K., Differential regulation of angiogenic genes in diabetic wound healing. *J. Invest. Dermatol.* 126 2323-31 (2006)
- Soga T, Ohishi T, Matsui T, Saito T, Matsumoto M, Takasaki J, Matsumoto S, Kamohara M, Hiyama H, Yoshida S, Momose K, Ueda Y, Matsushima H, Kobori M, Furuichi K, Lysophosphatidylcholine enhances glucose-dependent insulin secretion via an orphan G-protein-coupled receptor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 326 744e751 (2005).
- Stefan C, Jansen S, Bollen M. NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. *Trends Biochem. Sci.* 30: 542-550 (2005)
- Tsuda S, Okudaira S, Moriya-Ito K, Shimamoto C, Tanaka M, Aoki J, Arai H, Murakami-Murofushi K, Kobayashi T Cyclic phosphatidic acid is produced by autotaxin in blood. *J Biol Chem* 281: 26081–26088 (2006)
- Werdin F, Tennenhaus M, Schaller HE, Rennekampff HO. Evidence-based Management Strategies for Treatment of Chronic Wounds. *Eplasty.* 2009
- Wójcik M. „Badanie 3'-egzonukleolitycznej aktywności osocza ludzkiego wobec naturalnych i modyfikowanych oligonukleotydów”. Praca doktorska, Centrum badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN (2001)
- Yegutkin GG, Samburski SS, Jalkanen S. Soluble purine-converting enzymes circulate in human blood and regulate extracellular ATP level via counteracting pyrophosphatase and phosphotransfer reactions. *FASEB J.*, 17 1328–1330 (2003)
- Yea K, Kim J, Yoon JH, et al. Lysophosphatidylcholine activates adipocyte glucose uptake and lowers blood glucose levels in murine models of diabetes. *J Biol Chem.* 284(49):33833-40 (2009)
- Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta.*1783: 673–694 (2008)
- Zalatan JG, Fenn TD, Brunger AT, Herschlag D. Structural and functional comparisons of nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase and alkaline phosphatase: implications for mechanism and evolution. *Biochem.* 45: 9788-9803 (2006)
- Zizzo MG, Mastropalo M, Grählert J, Mulè F, Serio R. Pharmacological characterization of uracil nucleotide-preferring P2Y receptors modulating intestinal motility: a study on mouse ileum. *Purinergic Signal* 8(2): 275-85 (2012)

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych).

A) Etap pracy naukowej w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi, kierowanym wówczas przez prof. dr hab. Wojciecha Steca, zapoczątkował moje zainteresowanie badaniami nad tiofosforanowymi oligonukleotydami antysensowymi oraz tiofosforanowymi analogami nukleotydów. Zdobywając doświadczenia w zespole biologów molekularnych, kierowanym wówczas przez dr Marię Koziołkiewicz, zostałam wprowadzona w świat syntetycznych oligodeoksyrybonukleotydów, z którymi wiązano duże nadzieje pod kątem ich terapeutycznego zastosowania. Podstawą działania tych związków (efektu antysensowego) jest zdolność do hybrydyzacji z komplementarnymi fragmentami mRNA i tworzenia dwuniciowych struktur rozpoznawanych przez rybonukleazę H, która może degradować fragment mRNA znajdujący się w obrębie dupleksu. Mechanizm ten leży u podstaw specyficznej inhibicji ekspresji określonych genów. Ze względu na podatność niemodyfikowanych oligonukleotydów na działanie nukleaz, bardzo często wykorzystywano ich tiofosforanowe analogi, w których w każdym wiązaniu internukleotydowym atom tlenu w pozycji niemostkowej został zastąpiony atomem siarki. Oligo(nukleozydotiofosforany), będące izosterycznymi i izoelektronowymi analogami naturalnych oligonukleotydów, były pierwszą generacją antysensowych struktur. Mimo że oligonukleotydy tiofosforanowe okazały się bardziej stabilne, również i one były narażone na degradację przez enzymy nukleolityczne, a powstające produkty w postaci mononukleotydów mogły wywoływać dodatkowe efekty biologiczne. Celem badań prowadzonych przeze mnie w ramach pracy doktorskiej było więc określenie wpływu 5'-monofosforanów i 5'-monotiofosforanów deoksyrybonukleozydów (dNMPS) na wzrost wybranych linii komórkowych oraz wyjaśnienie mechanizmu odpowiedzialnego za ich aktywność biologiczną. Uzyskane przeze mnie dane wyjaśniły, dlaczego w wielu przypadkach oligonukleotydy, mimo że nie działają w sposób antysensowy, wywołują cytotoksyczny lub pro-mitotyczny efekt w sposób zależny od sekwencji. Zarówno sekwencja oligonukleotydu (różne proporcje uwalnianych potencjalnie dNMPS), jak i typ badanych komórek (zwłaszcza poziom ekto-5'-nukleotydyazy) odgrywają tu kluczową rolę. Badania stanowiące przedmiot rozprawy doktorskiej zwracały uwagę na możliwość istnienia na powierzchni pewnych typów komórek receptorów nukleotydowych aktywowanych również przez 5'-monotiofosforany deoksyrybonukleozydów. Hipoteza ta nie została jednak wówczas udowodniona. Praca doktorska zatytułowana „*Wpływ mononukleotydów i ich tiofosforanowych analogów na wzrost wybranych linii komórkowych - rola 5'-nukleotydyazy*” przygotowana w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Centrum Badań

Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi pod kierunkiem dr hab. Marii Koziółkiewicz, została obroniona w roku 2002.

Wyniki prac powstałych podczas przygotowywania rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w artykułach naukowych:

1. Koziółkiewicz M, Gendaszewska E, Maszewska M. Stability of stereoregular oligo(nucleoside phosphorothioate)s in human cells. Diastereoselectivity of cellular 3'-exonuclease. *Nucleosides & nucleotides* 16(7): 677-1682 (1997)

MNiSW - 15*, IF₁₉₉₇ = **0.905**, IF₂₀₁₅ = **0.876**, (5 letni IF=**0.880**) Cit – 3

Czasopismo w 2000 roku zostało przekształcone w *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*.

2. Koziółkiewicz M, Owczarek A, Gendaszewska E. Enzymatic assignment of diastereomeric purity of stereodefined phosphorothioate oligonucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 9(2): 171-181 (1999)

Czasopismo w 2003 roku zostało przekształcone w periodyk zatytułowany *Oligonucleotides*, a roku 2011 nastąpiła kolejna zmiana jego tytułu: *Nucleic Acid Therapeutics*

MNiSW - 30*, IF₁₉₉₉ = **3.441**, IF₂₀₁₅ = **2.813**, (5 letni IF = **2.567**) Cit – 11

3. Koziółkiewicz M, Gendaszewska E, Maszewska M, Stein CA, Stec WJ. The mononucleotide-dependent, nonantisense mechanism of action of phosphodiester and phosphorothioate oligonucleotides depends upon the activity of an ecto-5'-nucleotidase. *Blood.* 98(4): 995-1002 (2001).

MNiSW - 50*, IF₂₀₀₁ = **9.273**, IF₂₀₁₅ = **11.841**, (5 letni IF=**10.205**) Cit – 21

B) Jeszcze w trakcie trwania prac nad rozprawą doktorską moje zainteresowania tematyką terapeutycznych kwasów nukleinowych oraz antysensowych oligonukleotydów zaoowocowały serią publikacji poświęconych wewnątrzkomórkowej dystrybucji wprowadzanych oligonukleotydów, wykorzystaniu specyficznych oligonukleotydów antysensowych w celu obniżenia ekspresji białek oporności wielolekowej MRP oraz zastosowaniu dwuniciowej struktury kwasów nukleinowych w konstrukcji szczepionek DNA:

4. Gendaszewska E. Szczepionki DNA. *Postepy Biochem.* 1998;44(2):117-24.

MNiSW - 5*

5. Koziółkiewicz M, Owczarek A, Gendaszewska E. Enzymatic assignment of diastereomeric purity of stereodefined phosphorothioate oligonucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 9(2): 171-181 (1999)

Czasopismo w 2003 roku zostało przekształcone w periodyk zatytułowany *Oligonucleotides*, a roku 2011 nastąpiła kolejna zmiana jego tytułu: *Nucleic Acid Therapeutics*

MNiSW - 30*, **IF₁₉₉₉ = 3.441**, **IF₂₀₁₅ = 2.813** , (5 letni IF = **2.567**) **Cit –11**

6. Niewiarowski W, **Gendaszewska E**, Rebowski G, Wójcik M, Mikołajczyk B, Goss W, Soszyński M, Bartosz G. Multidrug resistance-associated protein--reduction of expression in human leukaemia cells by antisense phosphorothioate oligonucleotides. *Acta Biochim Pol.* 47(4): 1183-1188 (2000).

MNiSW - 15*, **IF₂₀₀₀ = 0.749**, **IF₂₀₁₅ = 1.489**, (5 letni IF=**1.422**) **Cit – 12**

7. Rębowski G, Wójcik M, Boczkowska M, **Gendaszewska E**, Soszyński M, Bartosz G, Niewiarowski W. Antisense hairpin loop oligonucleotides as inhibitors of expression of multidrug resistance-associated protein 1: their stability in fetal calf serum and human plasma. *Acta Biochim Pol.* 48(4): 1061-1076 (2001).

MNiSW - 15*, **IF₂₀₀₁ = 0.832**, **IF₂₀₁₅ = 1.489**, (5 letni IF=**1.422**) **Cit – 9**

8. Maszewska M, Kobylańska A, **Gendaszewska-Darmach E**, Koziółkiewicz M. Bromodeoxyuridine-labeled oligonucleotides as tools for oligonucleotide uptake studies. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 12(6):379-391 (2002).

Czasopismo w 2003 roku zostało przekształcone w *Oligonucleotides*, a roku 2011 w *Nucleic Acid Therapeutics*

MNiSW - 30*, **IF₂₀₀₂ = 2.303**, **IF₂₀₁₅ = 2.813** , (5 letni IF = **2.567**) **Cit – 1**

C) Od roku 2006 jednym z głównych obszarów moich zainteresowań badawczych jest aktywność biologiczna lizofosfolipidów, co zaprezentowałam w niniejszym autoreferacie. W wyniku rozwoju tych zainteresowań powstały prace, które nie zostały przeze mnie włączone do cyklu publikacji będących podstawą wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego [H-1 – H-9]. Należą do nich prace wymienione poniżej, w tym przegląd przygotowany na zaproszenie Edytora i opublikowany w czasopiśmie *Current Organic Chemistry*.

9. **Gendaszewska-Darmach E**. Lysophosphatidic acids, cyclic phosphatidic acids and autotaxin as promising targets in therapies of cancer and other diseases. *Acta Biochim Pol.* 55(2): 227-304 (2008)

MNiSW - 15*, **IF₂₀₀₈ = 1.448**, **IF₂₀₁₅ = 1.489**, (5 letni IF=**1.422**) **Cit – 23**

10. **Gendaszewska-Darmach E**, Drzazga A. Biological relevance of lysophospholipids and green solutions for their synthesis. *Curr Org Chem.*, 18, 2928-2949 (2014)

MNiSW - 30*, **IF₂₀₁₅ = 2.157**, **IF₂₀₁₅ = 1.949**, (5 letni IF=**2.436**) **Cit – 0**

11. Sowińska A, Rytczak P, **Gendaszewska-Darmach E**, Drzazga A, Koziółkiewicz M, Okruszek A. The chemical synthesis and preliminary biological studies of phosphodiester and phosphorothioate analogues of 2-methoxy-lysophosphatidylethanolamine. *Bioorg Med Chem Lett.* 26(15): 3725-9 (2016)

MNiSW - 25*, IF₂₀₁₅ = 2.486, (5 letni IF=2.303) Cit – 0

D) Inne podejmowane przeze mnie wątki badawcze związane są z wykorzystaniem aktywnych związków obecnych w ekstraktach roślinnych w celu opracowania preparatów stosowanych w profilaktyce lub leczeniu cukrzycy i schorzeń jej towarzyszących. Współpraca z dr inż. Małgorzatą Zakłos-Szyda oraz z zespołem dr inż. Anny Podsędek (Instytut Biochemii Technicznej) mającym duże doświadczenie w badaniach składu i aktywności przeciwutleniającej polifenoli izolowanych z roślin uprawnych i dziko rosnących połączona z wykorzystaniem pracowni hodowli komórkowych dała możliwość pogłębionej analizy aktywności przeciwcukrzycowej tych fitozwiązków. Analiza taka była możliwa dzięki kolekcji modelowych linii komórkowych niezbędnych do realizowania tej tematyki badawczej (m.in. β TC-3: mysie komórki insuliny, HepG2: ludzkie komórki wątroby, HaCaT: ludzkie keratynocyty, HDF: ludzkie fibroblasty skóry, HUVEC: ludzkie komórki śródbłoka żyły pępowinowej), jak również opracowaniu i doskonaleniu nowoczesnych metod badawczych.

Efektownością uczestnictwa w projektach badawczych poświęconych aktywnościom biologicznym ekstraktów polifenoli są dwie prace przeglądowe z moim współautorstwem.

12. Gołąbczak J, **Gendaszewska-Darmach E**. Ksantohumol i inne prenyloflawonoidy szyszek chmielu – aspekty biologiczne i technologiczne. *Biotechnologia* 1 (88), 75-89 (2010).

MNiSW - 13*

13. Majewska I, **Gendaszewska-Darmach E**. Proangiogenic activity of plant extracts in accelerating wound healing - a new face of old phytomedicines. *Acta Biochim Pol.* 58(4): 449-460 (2011).

MNiSW - 15*, IF₂₀₁₁ = 1.491, IF₂₀₁₅ = 1.489, (5 letni IF=1.422) Cit – 17

E) W roku 2014 rozpoczęłam zupełnie nowy kierunek badań nawiązując współpracę z dr inż. Katarzyną Błazewską (Wydział Chemiczny, Politechnika Łódzka). Zainteresowania naukowe dr Błazewskiej dotyczą między innymi poszukiwań niskocząsteczkowych syntetycznych inhibitorów enzymu geranylgeranilotransferazy Rab, która odgrywa istotną rolę w procesie prenylacji białek Rab. Dane literaturowe wskazują, że w komórkach nowotworowych czy chorobach neurodegeneracyjnych poziom ekspresji genów kodujących określone białka Rab jest zdecydowanie wyższy niż w komórkach prawidłowych. Przypuszcza

się, że inhibicja procesu prenylacji tych białek mogłaby pozwolić na kontrolę poziomu funkcjonalnych białek Rab. Część badań z wykorzystaniem ludzkich modeli komórkowych w ramach projektu SONATA BIS kierowanego przez dr inż. Katarzynę Błazewską („Projektowanie i synteza próbników Rab GGTazy i ich wykorzystanie do określenia miejsca oddziaływania fosfonokarboksylianowych inhibitorów z enzymem i identyfikacji potencjalnych oddziaływań ubocznych" (2014/14/E/ST5/00491) jest wykonywana pod moim kierunkiem. W realizację projektu zaangażowana jest mgr inż. Aleksandra Kaźmierczak (doktorantka w Instytucie Biochemii Technicznej PŁ), której wraz z dr inż. Katarzyną Błazewską jesteśmy opiekunami naukowymi.

Edyta Gendaszewska-Darmach
Podpis habilitanta

Łódź, 2 listopada 2016