

AUTOREFERAT

dr Patrycja Koszałka

Zakład Biologii Komórki
Katedra Biotechnologii Medycznej
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytet Gdański i Gdański Uniwersytet Medyczny

Gdańsk 2016

1. Imię i Nazwisko: Patrycja Koszałka

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

- 1995 magister biologii, specjalność mikrobiologia; Wydział Biologii, Geografii i Oceanografii, Uniwersytet Gdański; praca magisterska pt.: „Techniki izolacji i wstępna charakterystyka produktu genu 28 bakteriofaga T4”; promotor: dr Józef Nieradko
- 2000 doktor nauk medycznych; Wydział Lekarski, Akademia Medyczna w Gdańsku; rozprawa doktorska pt.: „Aktywność immunomodulacyjna i przeciwnowotworowa sklonowanego i oczyszczonego czynnika martwicy nowotworu (TNF) szczura”; promotor: dr hab. Jacek Bigda

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

- 1994-1995 staż dydaktyczny; Katedra i Zakład Histologii i Immunologii, Akademia Medyczna w Gdańsku; stanowisko: asystent stażysta
- 1995-2001 Katedra i Zakład Histologii i Immunologii, Akademia Medyczna w Gdańsku; stanowisko: asystent
- 2000-2003 staż naukowy po uzyskaniu stopnia doktora; Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie, Uniwersytet Heinricha-Heinego w Düsseldorfie, Niemcy; stanowisko: asystent
- 2001-2004 Zakład Biologii Komórki, Katedra Biotechnologii Medycznej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG-GUMed, Gdański Uniwersytet Medyczny; stanowisko: asystent
- od 2004 Zakład Biologii Komórki, Katedra Biotechnologii Medycznej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG-GUMed, Gdański Uniwersytet Medyczny; stanowisko: adiunkt

4. Osiągnięcie naukowe wynikające 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.):

Osiągnięcie naukowe wynikające 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 stanowi cykl 5 powiązanych tematycznie publikacji dotyczących zastosowania modelu myszy transgenicznej z knockoutem genu *cd73* dla oceny roli białka CD73 w funkcjonowaniu i rozwoju układu krwionośnego ze szczególnym uwzględnieniem wpływu CD73 na formowanie łożyska naczyniowego czerniaka B16F10. Cykl zawiera 5 prac oryginalnych. Prace te, publikowane w latach 2004-2015, są efektem wieloletniej interdyscyplinarnej współpracy z Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie na Uniwersytecie Heinricha-Heinego w Düsseldorfie, Niemcy. W trakcie wyjazdu naukowego w latach 2000-2003 stworzyłam tam, jako główny wykonawca, transgeniczną mysz z knockoutem genu *cd73*. Mysz ta została użyta jako model badawczy do analizy roli CD73 *in vivo* w pracach wchodzących w skład cyklu opublikowanych w latach 2004-2006 jako wynik stażu podoktorskiego oraz w latach 2014-2016 jako wynik grantu MNiSW uzyskanego w 2010 roku oraz zrealizowanego wcześniej projektu badań własnych w GUMed (2007-2008).

Łączna wartość współczynnika oddziaływania IF prac składających się na osiągnięcie wynosi **24,360**.
Łączna liczba punktów MNiSW prac składających się na osiągnięcie wynosi **139**.

A. Tytuł osiągnięcia naukowego:

Zastosowanie modelu myszy transgenicznej z knockoutem genu *cd73* dla oceny roli białka CD73 w funkcjonowaniu i rozwoju układu krwionośnego ze szczególnym uwzględnieniem wpływu na formowanie łożyska naczyniowego czerniaka B16F10.

B. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

- 4.1. **Koszalka P.**, Özüyan B., Huo Y., Zerneck A., Flögel U., Braun N., Buchheiser A., Decking U.K.M., Smith M.L., Sévigny J., Gear A., Weber A., Molojavyi A., Ding Z., Weber C., Ley K., Zimmermann H., Gödecke A., Schrader J.#. (2004) Targeted disruption of *cd73*/ecto-5'-nucleotidase alters thromboregulation and augments vascular inflammatory response. *Circulation Research*, 95(8): 814-21. IF: 9,972; MNiSW: 24. Udział w pracy: 55%.
- 4.2. Özüyan B., Ding Z., Buchheiser A., **Koszalka P.**, Braun N., Gödecke A., Decking U.K., Zimmermann H., Schrader J.#. (2006) Adenosine produced via the CD73/ecto-5'-nucleotidase pathway has no impact on erythropoietin production but is associated with reduced kidney weight. *Pflugers Arch.*, 452: 324-31. IF: 4,807; MNiSW: 20. Udział w pracy: 15%.
- 4.3. **Koszalka P.#**, Pryszlak A., Gołuńska M., Kolasa J., Stasiłojć G., Składanowski A.C., Bigda J.J. (2014) Inhibition of CD73 stimulates the migration and invasion of B16F10 melanoma cells *in vitro*, but results in impaired angiogenesis and reduced melanoma growth *in vivo*. *Oncol Rep.*, 31(2): 819-27. IF: 2,301; MNiSW: 20. Udział w pracy: 65%.
- 4.4. **Koszalka P.#**, Gołuńska M., Stanisławowski M., Urban A., Stasiłojć G., Majewski M., Wierzbicki P., Składanowski A.C., Bigda J. (2015) CD73 on B16F10 melanoma cells in CD73-deficient mice promotes tumor growth, angiogenesis, neovascularization, macrophage infiltration and metastasis. *Int J Biochem Cell Biol.*, 69: 1-10. IF: 4,046; MNiSW: 35. Udział w pracy: 65%.
- 4.5. **Koszalka P.#**, Gołuńska M., Urban A., Stasiłojć G., Stanisławowski M., Majewski M., Składanowski A.C., Bigda J. (2016) Specific activation of A₃, A_{2A} and A₁ adenosine receptors in CD73-knockout mice affects B16F10 melanoma growth, neovascularization, angiogenesis and macrophage infiltration. *PLoS One*, 11(3): e0151420. IF: 3,234; MNiSW: 40. Udział w pracy: 65%.

- autor korespondencyjny

Oświadczenia współautorów publikacji określające indywidualny wkład wybranych autorów (co najmniej czterech pozostałych współautorów dla prac zbiorowych z więcej niż pięcioma współautorami) w powstanie poszczególnych publikacji zamieszczono w **załączniku nr 7**. Oświadczenia habilitantki dotyczące wykonanych prac oraz procentowego w nich udziału znajdują się w **załączniku nr 8** (oraz **nr 4**).

W pracach zawarto wyniki uzyskane podczas realizacji pięciu projektów badawczych:

1. Deutsche Forschungsgemeinschaft (Niemcy), projekt SFB612 (2002-2004), Molekulare Analyse kardiovaskulärer Funktionen und Funktionsstörungen, podprojekt B6: Rolle der intrazellulären und extrazellulären Adenosinbildung durch die 5'-Nucleotidase bei der Kontrolle von Blutfluß und Hämostase;
2. Badania Własne GUMed, grant W-732 (2007-2008), Wdrożenie metod „Matrigel Plug Angiogenesis Assay” do analizy angiogenezy nowotworowej *in vivo*;
3. Deutsche Forschungsgemeinschaft (Niemcy), projekt SFB612 (2009-2012, kontynuacja), Molekulare Analyse kardiovaskulärer Funktionen und Funktionsstörungen, podprojekt B6: Rolle der *cd73*/ecto-5'-Nucleotidase in der extrazellulären Nucleotidkaskade bei akuter und chronischer Entzündung, Hypoxie und Angiogenese;

4. MNiSW, grant N N401 006938 (2010-2014), Wpływ metabolizmu adenozyiny na wzrost i rozwój czerniaka na modelu myszy z knock-outem ekto-5'-nukleotydyazy (CD73);
5. NCBiR, grant 256 09-0835/18 (2015-2018), Farmakoterapia śródbłonna naczyniowego i aktywacji płytek krwi zależna od prostacykliny, tlenku azotu i tlenku węgla – nowa strategia w zapobieganiu przerzutowości nowotworowej (akronim METENDOPHA); w ramach programu STRATEGMED: STRATEGMED1/233226/11/NCBR/2015, Profilaktyka i leczenie chorób cywilizacyjnych;

W projektach 2 i 4 pełniłam rolę kierownika, w pozostałych projektach byłam wykonawcą.

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

Celem naukowym prac wchodzących w skład mojego osiągnięcia naukowego i wymienionych powyżej była analiza roli CD73 w funkcjonowaniu i rozwoju układu krwionośnego ze szczególnym uwzględnieniem tego aspektu w formowaniu łożyska naczyniowego czerniaka B16F10 w trakcie jego progresji z użyciem modelu badawczego myszy transgeniczej z knockoutem genu *cd73*.

CD73/ekto-5'-nukleotydyaza jest enzymem o masie 70 kDa występującym na powierzchni komórki jako dimer zakotwiczony w błonie za pomocą GPI na końcu C-terminalnym a jego podstawową funkcją jest defosforylacja 5'-AMP do zewnątrzkomórkowej adenozyiny (Fig. 1). Jest on częścią zewnątrzkomórkowej kaskady, w której uczestniczy także enzym błonowy CD39, NTPDaza hydrolizująca ATP i ADP do AMP, będąca głównym źródłem AMP w środowisku zewnątrzkomórkowym. AMP może pochodzić także z degradacji obecnego w surowicy krwi NAD⁺ (dwunukleotydu nikotynoadeninowego) [Vaisitti et al., 2011; Zimmermann et al., 2012].

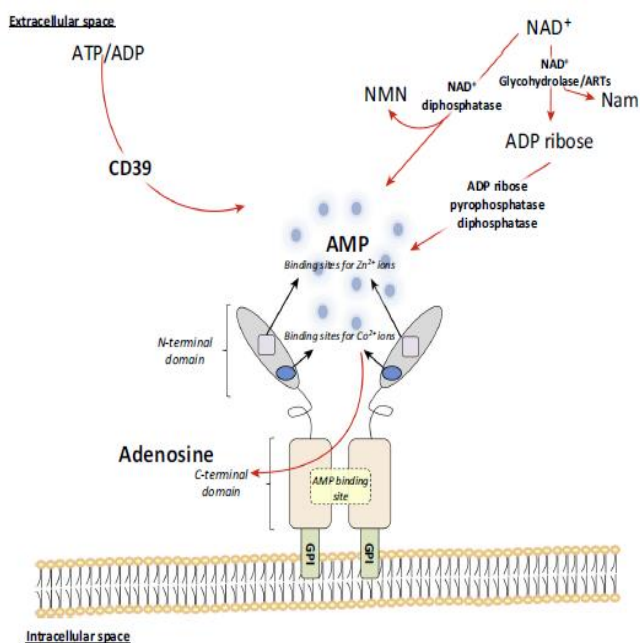


Fig. 1 Struktura CD73 (ekto-5'-nukleotydyazy) w błonie komórkowej i źródła substratu [Antonioli et al., 2016].

Produkcja zewnątrzkomórkowej adenozyiny jest bardzo ważnym procesem, ponieważ jest ona aktywną biologicznie cząsteczką regulującą różnorodne procesy biologiczne takie jak: odpowiedź immunologiczna i zapalna, wazodylatacja, uwalnianie przekazników nerwowych, lipoliza, funkcja barierowa śródbłonna, odpowiedź adaptacyjna na hipoksję (niedotlenienie) [Zimmermann, 1992; Colgan et al., 2006] i wiele innych funkcji, z których nowe są ciągle odkrywane.

Różnorodność funkcji adenozyiny jest związana z jej rolą jako cząsteczki sygnałowej. Adenozyina jest agonistą receptorów błonowych związanych z białkami G należących do grupy receptorów purynergicznego typu 1 (P1), do których zaliczamy receptory dla adenozyiny A₁, A_{2A}, A_{2B}, i A₃. Ogólnie, receptory A₁ i A₃ związane są z białkami G hamującymi aktywację cykazy adenylnowej prowadząc do zmniejszenia poziomu cAMP, a receptory A_{2A} i A_{2B} mają przeciwstawny efekt (Fig. 2). Receptor A₃ związany jest także m.in. z aktywacją 3-kinazy fosfatydoinozytoli (PI3K) oraz, tak jak receptor A_{2B}, z aktywacją fosfolipazy C. Efekty biologiczne wywierane przez adenozyinę zależą więc od ekspresji receptorów dla adenozyiny na powierzchni komórki docelowej i są zależne od typu komórki oraz jej stanu fizjologicznego. W warunkach fizjologicznych adenozyina aktywuje receptory o wysokim powinowactwie A₁, A_{2A}, i A₃ natomiast aktywacja receptora A_{2B} wymaga dużo wyższego stężenia adenozyiny obecnego w warunkach patologicznych [Fredholm, 2001; Schulte, 2003].

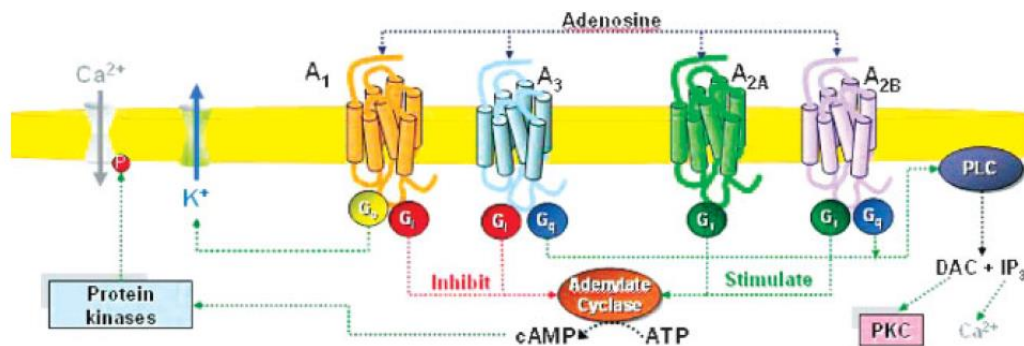


Fig. 2 Ogólny schemat pokazujący sygnalizację adenozyiny przez receptory purynergicznego P1 i jej wpływ na cyklazę adenylnową [Moro et al., 2006].

Innym źródłem zewnątrzkomórkowej adenozyiny może być wewnątrzkomórkowa hydroliza AMP lub S-adenozylhomocysteiny do adenozyiny i jej uwolnienie poprzez transportery adenozyiny (Fig. 3). Ten mechanizm generowania stężenia zewnątrzkomórkowej adenozyiny jest jej głównym źródłem jedynie w warunkach optymalnego natlenowania (normoksji).

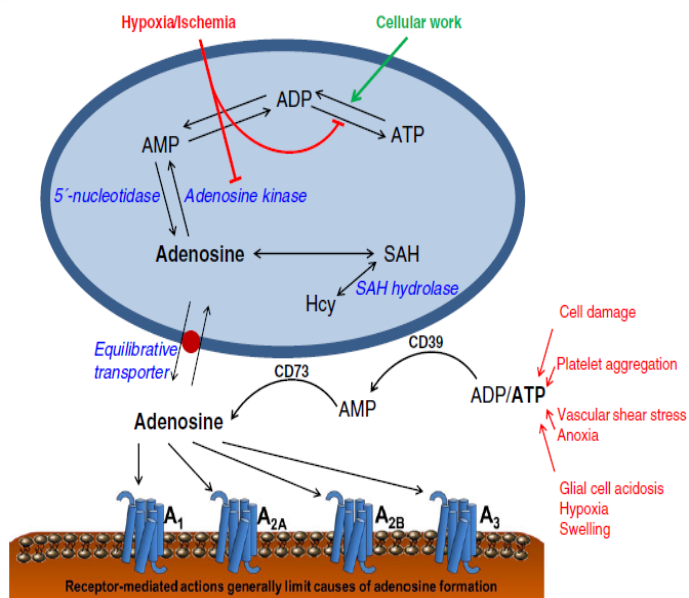


Fig. 3 Mechanizmy prowadzące do uzyskania zewnątrzkomórkowej adenozyiny w zależności od stanu fizjologicznego [Fredholm, 2014].

W warunkach patologicznych np. w hipoksji (niedotlenienie) czy w stanie zapalnym (który zwykle towarzyszy hipoksji) zewnątrzkomórkowa adenozyina generowana jest głównie przez CD73 w

zewnątrzkomórkowej kaskadzie hydrolizy AMP ulegając intensywnej akumulacji. Następnie jest usuwana poprzez refosforylację do AMP lub deaminację do inozyny [Fredholm, 2014; Zimmermann, 1992].

Przekształcając AMP do adenozyiny, CD73 nie tylko uczestniczy w aktywacji receptorów purynergicznym P1, ale także w zmniejszaniu ilości agonistów dla receptorów purynergicznym typu 2 (P2) takich jak ATP, ADP i NAD⁺. Ze względu na dużą wagę tych funkcji istnieją także inne enzymy defosforylujące nukleotydy, w tym przede wszystkim alkaliczna fosfataza, enzym powszechnie występujący, choć o niskim powinowactwie do AMP [Vaisitti et al., 2011; Zimmermann, 2012]. Dodatkowo, CD73 uczestniczy w procesach niezależnych od jego działania katalitycznego. Białko to jest bowiem uważane za cząsteczkę adhezyjną wiążącą lamininę i fibronektynę w substancji międzykomórkowej [Stochaj et al., 1989; Resta et al., 1998]. Sugerowane jest także, że może pełnić funkcje receptorowe w sygnalizacji limfocytów T [Resta i Thompson, 1997].

Obecność CD73 można wykryć w praktycznie wszystkich tkankach organizmu, choć nie na powierzchni wszystkich komórek [Zimmermann et al., 2012]. Jego ekspresja jest ściśle regulowana. Cytokiny prozapalne, takie jak interleukina-1 β czy TNF zwiększają ekspresję CD73 w stanach zapalnych a fosfolipazy mogą odcinać CD73 z powierzchni błony w miejscu kotwicy GPI. Ekspresja CD73 zwykle zwiększa się w procesie dojrzewania komórek, zwłaszcza w przypadku limfocytów T i B, migracji komórek oraz ich wzrostu. Hipoksja czy będąca jedną z jej przyczyn ischemia (niedokrwienie) są także czynnikami znacząco zwiększającymi ekspresję CD73 [Zimmermann, 1992; Colgan, 2006].

Obecność CD73 na komórkach śródbłonna znana była już od dawna [Airas et al., 1997]. Śródbłonek naczyniowy uważany jest za ważny autokryny/parakryny/endokryny narząd, którego funkcjonowanie w warunkach fizjologicznych jak i patologicznych ma znaczenie diagnostyczne, prognostyczne i terapeutyczne [Frolow et al., 2015]. Dlatego też rola CD73 w jego funkcjonowaniu, zwłaszcza w warunkach patologicznych wydawała się szczególnie ważna i warta zbadania.

Pracę nad analizą roli CD73 w układzie krwionośnym rozpoczęłam po obronie doktoratu w 2000 roku na stażu naukowym jako asystent w laboratorium prof. dr Jürgena Schradera w Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie (Departament of Cardiovascular Physiology) na Uniwersytecie Heinricha-Heinego w Düsseldorfie, Niemcy. Moim pierwszym zadaniem badawczym było uzyskanie nowego modelu myszy transgenicznej z knockoutem genu CD73 (ekto-5'-nukleotydyazy) w celu jego wykorzystania w projekcie SFB612 „Molekulare Analyse kardiovaskulärer Funktionen und Funktionsstörungen” („Analiza molekularna funkcjonowania układu krwionośnego i jego zaburzeń funkcjonalnych”) finansowanego przez Deutsche Forschungsgemeinschaft w latach 2002-2004. Ogólnym celem tego projektu była analiza złożonych mechanizmów regulatorowych kontrolujących adaptację organizmu lub tkanki do zaburzeń funkcjonalnych układu sercowo-naczyniowego lub jego schorzeń na poziomie genetycznym, biochemicznym i funkcjonalnym w oparciu o modele badawcze myszy transgenicznych. Projekt ten obejmował 6 podprojektów związanych z funkcją serca oraz 7 podprojektów związanych z funkcją układu naczyniowego włączając proces angiogenezy oraz stworzenie Bioanalytical Core Facility na Uniwersytecie Heinricha-Heinego. Zakres tego projektu obejmował współpracę z laboratorium prof. dr med. Herberta Zimmermanna w Institute for Cell Biology and Neuroscience, Goethe University, Niemcy oraz współpracę międzynarodową m.in. z laboratorium prof. dr Jeana Sévigny, Centre de Recherche en Rhumatologie et Immunologie, Sainte-Foy (Québec), Kanada. Z mojej strony byłam głównym wykonawcą podprojektu B6 („Rolle der intrazellulären und extrazellulären Adenosinbildung durch die 5'-Nukleotidase bei der Kontrolle von Blutfluß und Hämostase” - „Rola wzrostu wewnątrzkomórkowej i zewnątrzkomórkowej adenozyiny w wyniku działania 5'-nukleotydyazy w kontroli krążenia krwi i hemostazy”). Publikacja **4.1** wchodząca w skład osiągnięcia naukowego prezentuje wyniki wtedy uzyskane.

Dwa podstawowe osiągnięcia uzyskane w ramach tej pracy to:

a. Stworzenie pierwszego modelu myszy transgenicznej z konstytutywnym i kondycyjnym knockoutedem genu *cd73*.

Uzyskanie modelu myszy transgenicznej z knockoutedem genu *cd73* (praca 4.1) było niezbędne do oceny roli CD73 *in vivo*. Użycie inhibitorów nie blokuje całkowicie aktywności enzymatycznej CD73, a najbardziej wydajny inhibitor, AOPCP (adenosine α,β -methylene 5'-diphosphate), redukuje aktywność CD73 tylko do 25-30% kontroli [Agostinho et al., 2000; Hashikawa et al., 2003]. Przy wysokiej ekspresji CD73 na śródbłonku naczyniowym takie obniżenie aktywności mogłoby okazać się niewystarczające. Problemem w badaniach z użyciem drobnocząsteczkowego inhibitora było także jego usuwanie przez nerki oraz możliwy brak pełnej penetracji inhibitora w głąb mięszu tkanek. Opisany poniżej model badawczy został stworzony przez mnie w ramach pracy samodzielnej.

Aby uzyskać knockout genu *cd73*, czyli całkowite usunięcie funkcji tego genu z organizmu, zdecydowałam się na usunięcie z jego struktury egzonu II zawierającego „Phosphoesterase Signature Motive”, czyli motyw niezbędny dla prawidłowej funkcji miejsca aktywnego tego enzymu. Usunięcie całego egzonu wymaga wykorzystania rekombinacji homologicznej z wprowadzonym do komórki wektorem docelowym zawierającym miejsca homologiczne wobec miejsc otaczających wymieniany rejon. Jednakże rekombinacja homologiczna jest zjawiskiem rzadkim i wymaga selekcji. W tym celu używa się markerów selekcyjnych np. genu oporności na neomycynę. Do uzyskania knockoutu konstytutywnego zwykle wymienia się wybrany egzon na marker selekcyjny, co pozwala na kontrolę skuteczności rekombinacji. Jednakże obecność genu oporności wraz z promotorem (tzw. kasetą markerową) wprowadzonego do genomu może zaburzyć regulację genów znajdujących się w pobliżu [Pham et al., 1996]. Aby tego uniknąć a jednocześnie móc stworzyć konstytutywny i kondycyjny knockout, do modyfikacji genomu użyłam systemu miejscowo-specyficznych rekombinaz.

Rekombinaza Cre z bakteriofaga P1 *E.coli* rozpoznaje palindromiczną sekwencję DNA z asymetryczną wstawką, zwaną miejscem *loxP*. Fragment DNA obramowany przez dwa takie miejsca, mające taką samą orientację zostaje usunięty z genomu przez rekombinazę Cre. Użycie 3 miejsc *loxP*, przedstawione na poniższym schemacie (Fig. 4) pozwala na usunięcie markera selekcyjnego jak i na uzyskanie 3 typów delekcji.

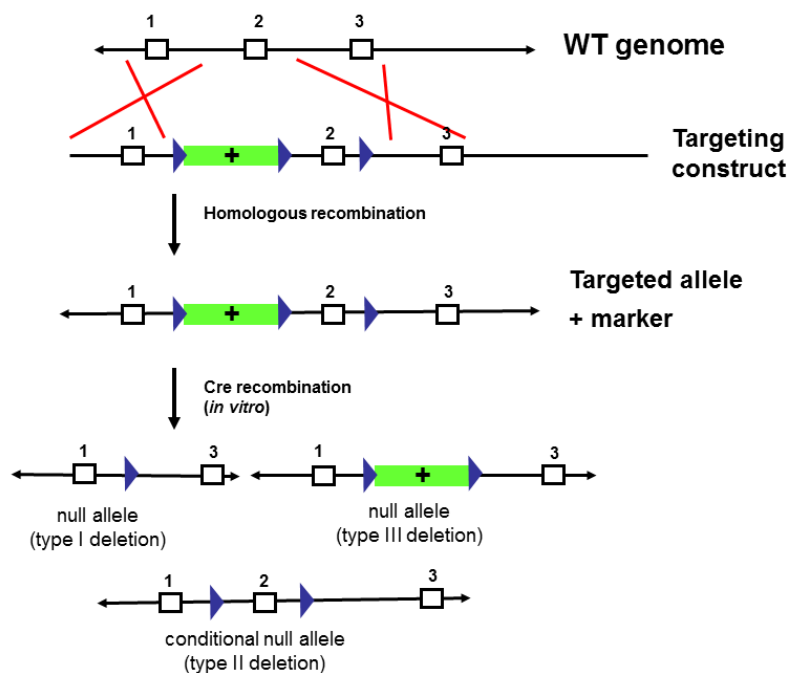


Fig. 4. Schemat otrzymania konstytutywnego i kondycyjnego knockoutu z użyciem systemu Cre/*loxP* [wg. Kwan et al., 2002]. Miejsca *loxP* zaznaczone jako trójkąty. Kasety markerowe do selekcji pozytywnej (+) jako prostokąty. Egzony są ponumerowane.

Metoda ta wymagała stworzenia złożonego wektora docelowego, następnie modyfikacji zarodkowych komórek pnia myszy, selekcji homologicznych rekombinantów i potwierdzenia ich uzyskania za pomocą PCR i analizy Southern blot. Uzyskane klonów z homologiczną rekombinacją poddałam przejściowej modyfikacji plazmidem wyrażającym rekombinazę Cre a następnie dokonałam selekcji klonów za pomocą PCR w kierunku właściwej delecji i potwierdziłam to za pomocą Southern blot. Dwie z trzech uzyskanych delecji stanowiły konstytutywny knockout z usuniętym zarówno wybranym egzonem jak i kasetą markerową oraz alternatywnie kondycjonalny knockout z egzonem II otoczonym miejscami *loxP* bez kasety markerowej. Zmiany w genomie potwierdziłam na poziomie genomu a w przypadku zmiany konstytutywnej także na poziomie RNA i białka. Uzyskane zarodkowe komórki pnia zostały przez mnie wprowadzone do blastocyst mysich w celu uzyskania chimer, które następnie po skrzyżowaniu dały dwie linie zwierząt: zwierzę pozbawione funkcji CD73, czyli konstytutywny knockout oraz zwierzę charakteryzujące się nadal aktywnością tego enzymu z możliwością jej utraty, czyli kondycjonalny knockout. Skrzyżowanie takiej myszy ze zwierzęciem zdolnym do wyrażenia genu rekombinazy Cre w postaci regulowanego ligandem białka fuzyjnego kontrolowanego przez tkankowo-specyficzny promotor, pozwala następnie, po podaniu liganda dla rekombinazy Cre i jej aktywacji, na wycięcie egzonu II i zablokowanie ekspresji tego genu w wybranym czasie i wybranej tkance.

Uzyskany model badawczy stworzony do tego projektu okazał się efektywnym modelem do analizy złożonych mechanizmów regulatorowych kontrolujących adaptację organizmu lub tkanki do zaburzeń funkcjonalnych będących celem projektu badawczego SFB612. Wyniki oparte na tym modelu badawczym umożliwiły kontynuację projektu SFB612 do roku 2012 (łącznie 14,6 mln Euro finansowania) i wykonanie innych analiz, w których części uczestniczyłam (osiągnięcia omówione w publikacji 4.2 wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego oraz w punkcie 5 - Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych) w ramach współpracy zagranicznej. Model ten wykorzystałam także w projekcie własnym finansowanym przez MNiSW w latach 2010-2014 (Wpływ metabolizmu adenozyiny na wzrost i rozwój czerniaka na modelu myszy z knockoutem ekto-5'-nukleotydyazy (CD73)).

b. Określenie po raz pierwszy znaczącej roli CD73 w regulacji homeostazy serca i naczyń krwionośnych.

W warunkach optymalnego natlenowania (normoksji) zewnątrzkomórkowa adenozyina produkowana jest głównie z udziałem nukleotydz cytoplazmatycznych i transportowana na zewnątrz komórki. Dlatego uważano, że CD73 odgrywa ważną rolę jedynie w warunkach niedokrwienia (ischemii) serca zwiększając w nim produkcję adenozyiny i tym samym pełniąc jedynie rolę pomocniczą w regulacji odpowiedzi na niedokrwienie [Zimmermann, 1992; Colgan et al., 2006]. Wyniki uzyskane na stworzonym przez mnie modelu transgenicznym pozwoliły po raz pierwszy wykazać, że aktywność hydrolityczna CD73 jest odpowiedzialna za 60% zmniejszenie ilości AMP w krwi perfundującej serce w warunkach normoksji i że ten spadek wpływa na szybkość perfuzji. To także było nowe odkrycie, bo do tej pory uważano, że zewnątrzpochodna adenozyina nie wpływa na regulację przepływu krwi w sercu [Kroll i Feigl, 1985].

Ponieważ zakrzepica naczyń jest powszechnym podłożem dla schorzeń serca wynikających z niedokrwienia [Golino, 2002] analizowaliśmy także rolę CD73 w dużych naczyniach takich jak aorta i tętnica szyjna w procesie formowania zakrzepu oraz w regulacji funkcji płytek krwi. Analiza histochemiczna wykazała, że CD73 pełni kluczową rolę hydrolizującą AMP do adenozyiny w dużych naczyniach, podczas gdy niespecyficzne fosfatazy (w tym alkaliczna fosfataza) wykazywały tam niewielką aktywność. Natomiast obniżony poziom cAMP w płytkach oraz zmniejszona trombogeneza w tętnicy szyjnej zwierząt z knockoutem genu *cd73* wskazały na duże znaczenie CD73 w regulacji tego procesu.

Przedstawiliśmy także po raz pierwszy dowody na rolę CD73 w regulacji przylegania leukocytów i monocytów do śródbłonka naczyniowego. Ich zwiększone przyleganie do śródbłonka naczyniowego u zwierząt z knockoutem genu *cd73* pod wpływem niedokrwienia wskazywały na ważną rolę tego enzymu w regulacji stanu zapalnego w śródbłonku naczyniowym polegającej na ochronie naczyń przed przyleganiem tych komórek układu immunologicznego. Jest to ważny aspekt, ponieważ ich wyprowadzenie poza światło

naczyń jest pierwszym i podstawowym krokiem w procesie inicjacji stanu zapalnego [Schnoor et al., 2015], a do tej pory to prostaglandyny i NO uważane były za głównych regulatorów funkcji śródbłonna naczyniowego.

Analizowane aspekty sugerowały znaczącą rolę CD73 w kardioprotekcji w stanach takich jak m.in. zawał mięśnia sercowego a związanych z zaburzeniami ukrwienia serca i prowadzących do niedotlenienia (hipoksji) a także w regulacji funkcji śródbłonna w stanie zapalnym, zwykle powiązanych z procesem niedotlenienia. Obecnie enzymatyczne role CD73 a także CD39 uznaje się za kluczowe w kontroli stanów patofizjologicznych związanych z procesem zapalnym np. w chorobach autoimmunologicznych, w zakażeniu patogenami, w miażdżycy i w wielu innych patologich w tym w chorobie nowotworowej. Sugerowana jest także rola tych enzymów jako potencjalnych celów terapeutycznych [Antonoli, 2013].

Znaczenie naszych wyników podkreśla artykuł wydawcy komentujący je na tle historycznym badań nad rolą CD73 w fizjologii układu sercowo-naczyniowego pod wiele mówiącym tytułem: "Cardiovascular Ecto-5'-Nucleotidase. An End to 40 Years in the Wilderness?" [Olsson, 2004].

Mysz z knockoutem genu *cd73* okazała się efektywnym modelem do kontynuacji badań związanych z wpływem niedotlenienia na funkcjonowanie naczyń krwionośnych i układu krwionośnego. W ramach współpracy w kontynuacji projektu SFB612 uczestniczyłam w projektowaniu i analizie doświadczeń związanych z rolą CD73 w regulacji funkcji nerek. Publikacja 4.2 prezentuje wyniki uzyskane w ramach tej współpracy a jej podstawowym osiągnięciem było:

c. Wykazanie, że CD73 jest kluczowym enzymem w produkcji zewnątrzkomórkowej adenozyiny w nerkach i jest ważny dla ich rozwoju ontogenetycznego, mimo że nie reguluje produkcji erytropoetyny.

Bardzo istotną zmianą zaobserwowaną u zwierząt z knockoutem genu *cd73* było wyraźne (ok. 21%) i statystycznie znaczące obniżenie względnej masy nerek. CD73 występuje w nerkach w kanalikach krętych proksymalnych i dystalnych, na powierzchni komórek mezangium kłębuszka oraz na fibroblastach tkanki śródmiąższowej [Le Hir i Kaissling, 1993]. W tym czasie wiadomo było, że jego ekspresja znacząco wzrasta w stanie anemii a stymulacja receptorów adenozyiny typu A_{2A} i A_{2B} na komórkach raka wątrobowokomórkowego (linia Hep3B) powodowała zwiększenie produkcji erytropoetyny (EPO) [Fisher i Brookins, 2001]. Jednakże doświadczenia *in vivo* na ludziach i szczurach poddanych niedotlenieniu w komorze hipobarycznej nie wykazywały różnic w produkcji erytropoetyny pod wpływem traktowania antagonistami czy agonistami receptorów adenozyiny [Gleiter et al., 1997a,b]. Erytropoetyna, glikoproteinowy hormon produkowany przez wątrobę i nerki nie tylko wpływa na komórki macierzyste szpiku kostnego, zwiększając produkcję erytrocytów pod wpływem niedotlenienia ale także jest w stanie regulować proces angiogenezy zarówno w warunkach fizjologicznych jak i patologicznych [Ribatti et al., 2003], oraz pobudzić komórki progenitorowe śródbłonna w procesie naprawy uszkodzonych naczyń także w przypadku uszkodzeń nerek [Bahlmann et al., 2004; Johnson et al., 2006]. Rozstrzygnięcie wątpliwości co do roli CD73 w regulacji tego hormonu było więc konieczne m.in. dlatego, że jedna z najczęściej stosowanych używek, kofeina, jest powszechnie znanym antagonistą receptora A_{2A} . Zostało to umożliwione przez zastosowanie modelu myszy z knockoutem genu *cd73*. Potwierdziliśmy wtedy wysoką ekspresję CD73 w nerkach zwierząt kontrolnych a także wykazaliśmy, że CD73 jest odpowiedzialna z produkcję powyżej 70% adenozyiny zewnątrzkomórkowej zarówno w warunkach normoksji jak i hipoksji. Natomiast niezależnie od podaży tlenu ekspresja EPO, zarówno na poziomie mRNA jak i białka nie ulegała zmianom u zwierząt z knockoutem genu *cd73*. Nie ulegał zmianie także hematokryt krwi analizowanych zwierząt. Nie stwierdzono także powstawania efektu kompensatorowego u zwierząt z knockoutem, ponieważ poziom alkalicznej fosfatazy był u nich na podobnym poziomie jak u zwierząt niemodyfikowanych.

Dwie możliwe przyczyny obserwowanych zmian we względnej masie nerek były brane pod uwagę. Pierwsza, związana była z zaproponowaną w tym czasie rolą generowanej przez CD73 adenozyiny w modulacji cewkowo-kłębuszkowego sprzężenia zwrotnego (TGF), mechanizmu regulującego filtrację

kłębuszkową poprzez działanie plamki gęstej (*macula densa*) będącej czujnikiem stężenia chlorku sodu w nerkach [Castrop et al., 2004]. Sugerowała, że zmiana masy nerek jest bezpośrednim efektem zmian w regulacji przesączania kłębuszkowego. Mimo, że nie było znaczących zmian w przepływie moczu przez nerki ten aspekt został zbadany dalej z użyciem metody mikroperfuzji kanalików proksymalnych nerek, aby uzyskać pełen obraz regulatorowej funkcji CD73 w regulacji TGF. Uczestniczyłam w tej analizie, a jej wnioski przedstawiłam w punkcie 5 - Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

Z drugiej strony, wcześniej wykazano nie tylko korelację między ekspresją CD73 a syntezą DNA w komórkach mezangium [Le Hir i Kaissling, 1993] ale także przedstawiono dowody na rolę VEGF (izoforma 165/164) w regulacji funkcji nerek poprzez zwiększenie przepuszczalności naczyń krwionośnych kłębuszka naczyniowego oraz ich regenerację w przypadku uszkodzenia [Ostendorf et al., 1999]. Sugerowało to, że zmiany w masie nerek mogły powstać w trakcie ich ontogenetycznego dojrzewania w wyniku regulowanych przez CD73 zmian w procesie formowania struktury i unaczynienia nerek.

Właśnie w tym czasie zaczęto uznawać adenozyne za kluczowy czynnik regulujący proces angiogenezy przede wszystkim poprzez bezpośredni wpływ stymulujący na proliferację komórek śródbłonna jak i pośrednio poprzez regulację produkcji czynników pro- i anti-angiogennych głównie w wyniku stymulacji receptorów A_{2A} i A_{2B} . Zasugerowano, że adenozyne może odpowiadać za 50-70% odpowiedzi angiogennej na zaburzenia związane z hipoksją/ischemią, zwłaszcza poprzez stymulację ekspresji VEGF (Fig. 5) [Adair, 2005; Auchampach, 2007]. Obecnie ochronna rola adenozyne poprzez regulację ekspresji VEGF w uszkodzeniach nerek jest już powszechnie uznawana a receptory adenozyne stanowią potencjalny nowy cel terapeutyczny [San Martin et al., 2009; Patel i Thaker, 2015].

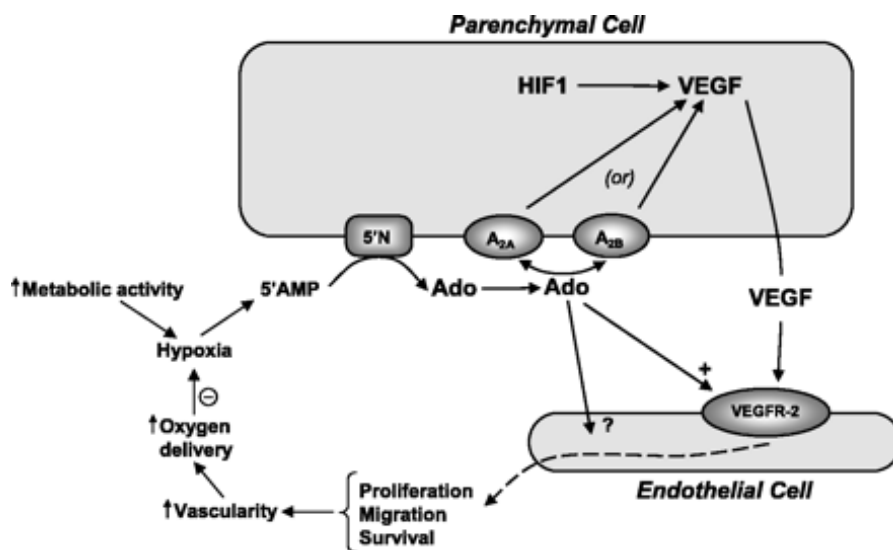


Fig. 5. Rola adenozyne w regulacji proliferacji śródbłonna naczyniowego poprzez regulację ekspresji VEGF [Adair, 2005].

Te same procesy naprawcze, które zachodzą w uszkodzonych organach wykorzystywane są także przez nowotwory w celu wytworzenia łożyska naczyniowego. Ponieważ w niedostatecznie ukrwionych guzach litych w wyniku hipoksji obserwowano znaczną akumulację adenozyne, zwrócono uwagę jej rolę w kontroli progresji nowotworowej [Spychala, 2000]. Rozwój naczyń krwionośnych guza nowotworowego jest powszechnie rozpoznawany jako czynnik regulujący wzrost guza, a moment pobudzenia procesu angiogenezy jako etap związany z aktywacją fenotypu inwazyjnego w procesie zwanym „angiogenic switch”. Prace kliniczne wykazały pozytywną korelację zwiększonej ekspresji CD73 na powierzchni komórek nowotworowych ze stopniem zaawansowania nowotworu jelita grubego czy czerniaka [Eroglu et al., 2000; Sądej et al., 2006] choć dla raka piersi obserwowano raczej odwrotną korelację [Krüger et al., 1991]. Dalsze prace nad powiązaniem ekspresji CD73 z rozwojem nowotworów u pacjentów [przedstawione w

przeglądówce Gao et al., 2014] wprowadziły jeszcze większe kontrowersje co do roli CD73 w tym procesie. Jednocześnie wskazały na konieczność dokładnego zbadania mechanizmów tego powiązania. Większość z tych badań skupiało się na funkcji CD73 w regulacji działania układu immunologicznego, głównie limfocytów T i B [Kumar i Sharma, 2009]. Dlatego też postanowiłam skupić się na aspektach pro-angiogennych roli CD73 w rozwoju nowotworów.

Ze względu na moje doświadczenie nad analizą roli czynnika martwicy nowotworu (TNF) w progresji czerniaka Bomirskiego chomika syryjskiego w ramach pracy doktorskiej (opisane w punkcie 5) oraz w pracy nad rolą CD73 w układzie sercowo-naczyniowym postanowiłam przedstawić jak najszerszy obraz roli CD73 w regulacji progresji czerniaka, jego wzrostu i fenotypu inwazyjnego poprzez regulację formowania łożyska naczyniowego guza z uwzględnieniem roli poszczególnych receptorów adenozyiny w tym procesie.

Jako model badawczy do analizy wybrałam mysiego czerniaka B16F10, nowotwór szybko rosnący i słabo ukrwiony o wysokim stopniu złośliwości i niskiej aktywności enzymatycznej CD73 [Raz et al., 1980; Schroeder et al., 1984]. Jego zaszczerpienie podskórne w myszy z knockoutem genu *cd73* i zastosowanie inhibitora CD73, AOPCP, dzięki nieobecności tego enzymu na komórkach gospodarza oraz niskiej, łatwej do zablokowania aktywności na komórkach nowotworowych, umożliwiło analizę zmian podczas progresji czerniaka przy praktycznie całkowitej deplecji funkcji tego enzymu. Alternatywnie zastosowałam także stabilną interferencję RNA dla transkryptu genu *cd73* w komórkach B16F10. Zastosowanie w warunkach deplecji CD73 specyficznych agonistów receptorów dla adenozyiny o wysokim powinowactwie A₁, A_{2A} i A₃, pozwoliło na analizę roli poszczególnych receptorów *in vivo* bez tła endogennej adenozyiny generowanej przez CD73.

Jednakże przed rozpoczęciem badań konieczne było:

1. Zmodyfikowanie tła genetycznego myszy transgenicznnych do tła szczepu myszy C57BL/6, powszechnego dla modeli myszy transgenicznnych i syngenicznego wobec powszechnie używanych modeli nowotworów, w tym czerniaka B16F10. Zwierzęta uzyskiwane z użyciem zarodkowych komórek pnia są mieszańcami genetycznymi, ponieważ dla zwiększonej żywotności zarodkowe komórki pnia uzyskiwane są z embrionów powstałych w wyniku krzyżówek różnych szczepów, a uzyskane chimery krzyżowane są ze szczepem niekrewniaczym. Modyfikacja tła genetycznego wymaga krzyżówek wsobnych, gdzie mysz transgeniczna krzyżowana jest z myszą ze szczepu C57BL/6, następnie z potomstwa wybierana jest mysz z modyfikacją genetyczną i ponownie krzyżowana z myszą ze szczepu C57BL/6, przez przynajmniej 10 pokoleń.
2. Dłuższa hodowla sprowadzonych kilku par rozplodowych myszy z knockoutem genu *cd73* i tłem genetycznym C57BL/6 do momentu uzyskania wystarczającej puli populacji, tak by móc pozyskiwać zwierzęta do doświadczeń, bez utraty szczepu.
3. Wprowadzenie do laboratorium Zakładu Biologii Komórki Katedry Biotechnologii Medycznej MWB UG-GUMed metodyki umożliwiającej efektywną analizę procesu angiogenezy. W ramach badań własnych GUMed W-732 „Wdrożenie metod „Matrigel Plug Angiogenesis Assay” do analizy angiogenezy nowotworowej *in vivo*” jako jego kierownik i główny wykonawca wprowadziłam do naszego laboratorium narzędzie badawcze pozwalające na bardzo efektywną ocenę procesu angiogenezy *in vivo* z użyciem czopów Matrigelu [Norrby, 2006]. Podskórne wprowadzenie substancji podstawowej mięsaka EHS czyli Matrigelu powoduje formowanie się czopu w wyniku polimeryzacji. Jego izolacja po 8 dniach i analiza ilości/objętości nowych naczyń, które go przerosły umożliwia bezpośrednią ocenę procesu angiogenezy. Podanie do Matrigelu komórek nowotworowych i/lub substancji aktywnych pozwala na analizę ich wpływu na proces angiogenezy.

Przed doświadczeniami *in vivo* skupiłam się na analizie wpływu modulacji aktywności CD73 na fenotyp inwazyjny komórek B16F10 *in vitro*. Uzyskane wstępne wyniki z doświadczeń *in vitro* jak i *in vivo* z czopami Matrigelu na zwierzętach niemodyfikowanych pozwoliły mi na uzyskanie grantu MNiSW N N401 006938 "Wpływ metabolizmu adenozyiny na wzrost i rozwój czerniaka na modelu myszy z knock-outem ekto-5'-nukleotydu (CD73)" i kontynuację badań. Publikacje **4.3**, **4.4** i **4.5** wchodzące w skład osiągnięcia

naukowego prezentują wyniki uzyskane w ramach tych doświadczeń. Podstawowe osiągnięcia przedstawione w tych pracach składające się na szeroki obraz roli CD73 i receptorów adenozyiny w formowaniu łożyska naczyniowego i progresji czerniaka to:

d. Wykazanie, że CD73 na powierzchni komórek nowotworowych odgrywa ważną rolę w regulacji wzrostu czerniaka B16F10 m.in. regulując jego potencjał proliferacyjny poprzez wpływ na receptory adenozyiny.

Już wcześniej wykazano, że wzrost podskórnego guza czerniaka B16F10 jest zahamowany w gospodarzu z knockoutem genu *cd73* [Stagg et al., 2011; Yegutkin et al., 2011]. Czasami jednak tego efektu nie obserwowano [Burghoff et al., 2014]. Wykazaliśmy, że powodem tej kontrowersji było błędne scharakteryzowanie linii B16F10 jako CD73-negatywnej i pominięcie wyraźnego wpływu CD73 na komórkach nowotworowych na wzrost czerniaka. Wykazaliśmy za pomocą analizy Western blot i immunofluorescencji, że ekspresja CD73 w komórkach linii B16F10 jest wysoka, choć tylko niewielka ilość tego enzymu jest obecna na powierzchni komórki (4.3), wyjaśniając w ten sposób niską ale ciągle wykrywalną aktywność enzymatyczną tych komórek [Raz et al., 1980; Schroeder et al., 1984]. Wskazaliśmy również, że zastosowanie jedynie cytometrii przepływowej do analizy ekspresji CD73 jest podejściem błędnym, ponieważ daje ona fałszywie negatywny wynik prawdopodobnie w wyniku złuszczenia CD73 z powierzchni komórki poprzez wiążące się przeciwciała. Poddając CD73 na powierzchni komórek czerniaka inhibicji poprzez systemowe podanie inhibitora lub stosując stabilną interferencję RNA wykazaliśmy, że nawet ta niewielka aktywność CD73 na komórkach czerniaka B16F10 była wystarczająca do pobudzenia wzrostu guza w sposób znaczący. Sprawiało to, że wyniki uzyskane w sytuacji wyeliminowania jedynie aktywności CD73 u gospodarza były na granicy znaczenia statystycznego (4.3 i 4.4).

Dodatkowo, obserwowane zahamowanie wzrostu guza przypisano przede wszystkim zmianom w aktywności układu immunologicznego, głównie limfocytów Treg [Stagg et al., 2011; Yegutkin et al., 2011]. Naszą zasługą było natomiast stwierdzenie, że całkowita eliminacja CD73 hamuje potencjał proliferacyjny komórek nowotworowych poprzez obniżenie ekspresji pERK1/2, aktywnej ufosforylowanej formy kinazy ścieżki proliferacyjnej Ras-Raf-MEK-ERK (szlak MAPK). Wykazaliśmy również, że stymulacja pojedynczego receptora adenozyiny początkowo hamowała wzrost guza, ale w dalszych fazach jego tempo wzrostu znacznie przyspieszało korelując ze zwiększoną ekspresją pERK1/2 (4.5). Potwierdza to obserwowany wcześniej, choć jedynie *in vitro*, dwufazowy efekt aktywacji receptorów adenozyiny, zwykle prowadzący do stymulacji szlaku MAPK ale czasami do jego inhibicji [Schulte i Fredholm, 2003].

e. Potwierdzenie znaczącego stymulującego wpływu CD73 na formowanie unaczynienia guzów nowotworowych.

Co ciekawe, w pracach traktujących linię B16F10 czerniaka mysiego jako CD73-negatywną wykluczono rolę CD73 w kontroli procesu angiogenezy [Yegutkin et al., 2011; Burghoff et al., 2014] (w publikacji Stagg et al., 2011 zastosowano inhibicję CD73 przeciwciałami anti-CD73 ale nie analizowano wpływu CD73 na angiogenezę). Okazało się to niezgodne z uzyskanymi przez nas wynikami. Jeszcze przed analizą wpływu CD73 na wzrost guza wykazaliśmy za pomocą testu *in vivo* na podskórnych czopach Matrigelu, że zarówno CD73 na komórkach organizmu gospodarza jak i na komórkach czerniaka B16F10 ma wpływ na rozwój naczyń krwionośnych (porównane były: czop kontrolny i czop z domieszanymi komórkami nowotworowymi). Powtórzenie tych doświadczeń na modelu myszy z knockoutem genu *cd73* potwierdziło rolę CD73 na komórkach gospodarza w procesie angiogenezy. Pokazało to też, że model ten nie wykazuje w wyniku modyfikacji genetycznych zmian o charakterze kompensatorowym, które mogłyby powodować błędną interpretację wyników. Obserwowaliśmy wyraźne zmiany w ilości naczyń krwionośnych pod wpływem eliminacji CD73 prowadzące do zwiększonej martwicy krwotocznej guzów oraz pojawienia się markera hipoksji, jakim jest białko pro-apoptotyczne Bad (4.3 i 4.4). Jako pierwsi potwierdziliśmy kluczową rolę CD73 w procesie angiogenezy *in vivo* w modelu czerniaka, a dwie wyprzedzające nas publikacje [Wang et al., 2013; Allard et al., 2014] przedstawiły jego rolę w regulacji unaczynienia guza gruczolą piersiowego.

f. Określenie mechanizmu regulacji unaczynienia czerniaka B16F10 przez CD73 oraz roli receptorów dla adenozyiny A₁, A_{2A} i A₃ w tym procesie.

Rola adenozyiny jako czynnika regulującego proliferację komórek śródbłonna i produkcję czynników pro- i anty-angiogennych, potwierdzona została głównie w doświadczeniach *in vitro* na liniach komórkowych lub hodowlach pierwotnych [Adair, 2004; Auchampach, 2007]. Natomiast analiza roli receptorów dla adenozyiny w nowotworach nie została prawie w ogóle przeprowadzona *in vivo*. W raku płuc wykazano rolę receptora A_{2B} o niskim powinowactwie do adenozyiny w regulacji ekspresji VEGF przez komórki gospodarza [Ryzhov et al., 2008] a Allard et al. [2014] w mysim raku piersi wykazali bezpośrednią korelację między ekspresją CD73, gęstością naczyń a ekspresją VEGF. Do tej pory brakowało więc systematycznej analizy co do roli receptorów adenozyiny w rozwoju nowotworów *in vivo*.

W naszych pracach (4.4 i 4.5) zaprezentowaliśmy dużo bardziej złożoną rolę CD73 i receptorów adenozyiny w regulacji procesu angiogeny. Wykazaliśmy za pomocą analizy IHC, że wyeliminowanie aktywności CD73 prowadzi do znaczącego obniżenia pobudzenia angiogenetycznego naczyń krwionośnych (ekspresja VEGF-R2) oraz ich dojrzałości (ekspresja CD105/endoglinu). Używając nowej metody (Mouse Cytokine Antibody Arrays firmy RayBiotech, Norcross, USA) pozwalającej na półilościową analizę ekspresji wielu cytokin jednocześnie, wykazaliśmy również zmiany w ekspresji większości spośród 96 analizowanych cytokin pro- i anty-angiogennych w mikrośrodkowisku guza zachodzące wskutek deplecji aktywności CD73.

Zaproponowaliśmy także rolę poszczególnych receptorów adenozyiny w tym procesie, po raz pierwszy analizując ją w warunkach *in vivo*, bez endogennego tła adenozyiny a także jednocześnie dla wszystkich trzech receptorów o wysokim powinowactwie. Wykazaliśmy, że każdy z tych receptorów uczestniczy w regulacji procesu angiogenezy jednakże w odniesieniu do różnych elementów tego procesu. Aktywny receptor A₃ najsilniej stymulował wzrost gęstości naczyń oraz ekspresję czynników pro-angiogennych ale to receptor A₁ najsilniej stymulował pobudzenie angiogenne śródbłonna naczyń zwiększając ekspresję receptora VEGF-R2.

g. Dowód na istotną rolę CD73 oraz sygnalizacji poprzez receptory adenozyiny w naciekaniu guza pierwotnego przez makrofagi oraz w regulacji polaryzacji fenotypowej makrofagów.

Makrofagi związane z nowotworami (tumor associated macrophages, TAMs) posiadające fenotyp przeciwwzapalny i proangiogeny typu MII odgrywają ważną rolę w stymulacji unaczynienia oraz potencjału inwazyjnego komórek nowotworowych [Eljaszewicz et al., 2013]. W raku płuc wykazano, że hipoksja stymuluje polaryzację makrofagów do fenotypu MII z prozapalnego i anty-angiogenego fenotypu MI [Zhang et al., 2014]. Yegutkin ze współpracownikami [2011] zasugerowali rolę CD73 w kontroli tego procesu. Nasze doświadczenia wykazały, że deplecja CD73 znacząco hamowała infiltrację guza przez makrofagi oraz ekspresję cytokin w mikrośrodkowisku guza związanych z polaryzacją makrofagów do fenotypu MII oraz, co było zaskakujące, także do fenotypu MI (4.4). Stymulacja receptora adenozyiny A₃ całkowicie odwracała wszystkie wymienione zmiany, natomiast stymulacja receptora A_{2A} zwiększała infiltrację makrofagów, choć jednocześnie zmniejszała ekspresję cytokin stymulujących fenotyp MI (4.5).

Jako pierwsi udowodniliśmy rolę CD73 i receptorów adenozyiny w regulacji naciekania guza pierwotnego makrofagami. Nasze dane nie tylko wzmocniły przypuszczenia dotyczące promowania pro-angiogenego fenotypu makrofagów przez CD73, ale także pozwoliły nam zaproponować, jako pierwszym, rolę tego enzymu w kontroli fenotypu anty-angiogenego.

h. Dowód na istotną rolę CD73 w supresji fenotypu inwazyjnego komórek czerniaka *in vitro* poprzez mechanizmy zależne i niezależne od adenozyiny.

CD73 uważany jest za cząsteczkę adhezyjną wiążącą lamininę i fibronektynę w substancji międzykomórkowej [Stochaj et al., 1989; Resta et al., 1998]. Bezpośrednią rolę CD73 w przyleganiu komórek nowotworowych do substancji międzykomórkowej potwierdzono już wcześniej dla komórek raka piersi. Wykazano także, że nadekspresja CD73 zwiększała nie tylko zdolność komórek raka piersi do przylegania do

ECM ale także przyspieszała migrację komórek i inwazję *in vitro* [Zhou et al., 2007]. Zaslugą zespołu, którym kierowałam było potwierdzenie bezpośredniej roli CD73 jako cząstki adhezyjnej w przyleganiu komórek czerniaka do ECM i jednocześnie wykazanie za pomocą inhibitora drobnocząsteczkowego wobec CD73, że CD73 hamuje migrację i zdolności do inwazji tych komórek. Dodatkowo, wykazaliśmy, że aktywacja receptora A₁ najsilniej hamowała migrację a aktywacja receptora A₃ zdolność do inwazji ECM (4.3). Ponieważ wykazaliśmy, że efekty związane z migracją i inwazją, rozbieżne dla raka piersi i czerniaka, są regulowane poprzez różne receptory adenozyiny, nasze wyniki mogą tłumaczyć także kontrowersje związane z korelacją ekspresji CD73 z rozwojem nowotworów obserwowane w warunkach klinicznych [Gao et al., 2014]. Wiadomo bowiem że istnieją znaczne różnice w ekspresji poszczególnych receptorów adenozyiny na powierzchni komórek używanych do doświadczeń. Nasze badania wskazują więc, że analiza CD73 jako markera progresji nowotworów niezależnie od ekspresji receptorów adenozyiny musi być prowadzona specyficznie dla każdego typu nowotworu i bez wyciągania ogólnych wniosków.

i. Dowód na istotną rolę CD73 w stymulacji ekstrawazacji komórek nowotworowych *in vivo*.

In vivo, w modelu doświadczalnym przerzutów gdzie podanie dożylnie komórek nowotworowych pozwala analizować ich ekstrawazację i formowanie przerzutów, potwierdziliśmy znaczącą rolę CD73 w stymulacji tego procesu. Już wcześniej pojawiały się sugestie, że CD73 obecny na komórkach niehematopoetycznych, zwłaszcza na śródbłonku, kontroluje ich przyleganie do śródbłonka naczyniowego poprzez regulację produkcji adenozyiny [Allard et al., 2012]. My natomiast udowodniliśmy, jako pierwsi, że białko to kontroluje przyleganie komórek B16F10 do śródbłonka naczyniowego a efekt ten jest niezależny od CD73 obecnego na komórkach śródbłonka naczyniowego (4.4).

Część projektu związana z analizą roli sygnalizacji adenozyiny w progresji czerniaka stanowi podstawę rozprawy doktorskiej Moniki Gołuńskiej (uczestniczyłam w opiece naukowej nad projektem badawczym doktorantki). Pani Monika Gołuńska jest współautorem publikacji 4.3, 4.4 i 4.5 tworzących ciąg habilitacyjny.

Podsumowując wyniki i wnioski w publikacjach zawartych w dziele habilitacyjnym mogę stwierdzić, że stanowiły one ważny wkład w określenie znaczącej roli CD73 w regulacji fizjologii i patofizjologii układu krążenia w tym przede wszystkim w formowania łożyska naczyniowego guzów nowotworowych, choć aspekt ten może mieć bardziej uniwersalne znaczenie. Zaburzenia funkcji układu krążenia związane są z zaburzeniami produkcji wolnych rodników tlenowych, krzepnięcia oraz produkcji czynników pro-zapalnych. Są charakterystyczne nie tylko dla zmian związanych z rozwojem nowotworu, ale także zaburzeń układu rozrodczego (np. endometrioza, zespół policystycznych jajników), układu nerwowego (np. niedokrwienny udar mózgu) czy serca (niedokrwienny udar serca i następujące po nim zmiany w unaczynieniu serca oraz inne zaburzenia związane z niedotlenieniem). Poznanie roli CD73 w regulacji tych zaburzeń a także ustalenie, jakie aspekty zależne są od poszczególnych typów receptorów adenozyiny może pozwolić na opracowanie nowych potencjalnych związków terapeutycznych. Zwłaszcza, że dostępne obecnie inhibitory adenozyiny są dobrze tolerowane w podaniu systemowym, podobnie jak większość agonistów czy antagonistów receptorów adenozyiny. Wystarczy tutaj wspomnieć, że jedna z najpopularniejszych używek, kofeina, jest antagonistą receptora adenozyiny A_{2A}. Potencjał kliniczny takich związków jest obecnie coraz lepiej dostrzegany. W ramach toczącego się właśnie projektu METENDOPHA "Farmakoterapia śródbłonka naczyniowego i aktywacji płytek krwi zależna od prostacykliny, tlenku azotu i tlenku węgla – nowa strategia w zapobieganiu przerzutowości nowotworowej" (2015-2018) część projektu, którego jestem wykonawcą poświęcona jest właśnie dalszej analizie zewnątrzkomórkowego metabolizmu adenozyiny, w tym roli CD73 w analizowanych procesach formowania przerzutów nowotworowych. W projekcie tym planowane jest testowanie *in vivo* nowych, potencjalnie terapeutycznych związków.

Bibliografia

- Adair T.H. (2005) Growth regulation of the vascular system: an emerging role for adenosine. *Am J Physiol.*, 289: R283–R296.
- Agostinho P., Caseiro P., Rego A.C., Duarte E.P., Cunha R.A., Oliveira C.R. (2000) Adenosine modulation of D-(3H)aspartate release in cultured retina cells exposed to oxidative stress. *Neurochem Int.*, 36: 255-65.
- Airas L., Niemelä J., Salmi M., Puurunen T., Smith D.J., Jalkanen S. (1997) Differential regulation and function of CD73, a glycosyl-phosphatidylinositol-linked 70-kD adhesion molecule, on lymphocytes and endothelial cells. *J Cell Biol.*, 136: 421-31.
- Allard B., Turcotte M., Spring K., Pommey S., Royal I., Stagg J. (2014) Anti-CD73 therapy impairs tumor angiogenesis. *Int J Cancer*, 134: 1466–73.
- Antonioli L., Pacher P., Vizi E.S., Haskó G. (2013) CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med.*, 19: 355-67.
- Antonioli L., Yegutkin G.G., Pacher P., Blandizzi C., Haskó G. (2016) Anti-CD73 in Cancer Immunotherapy: Awakening New Opportunities. *Trends in Cancer*, 2: 295-107.
- Auchampach J.A. (2007) Adenosine receptors and angiogenesis. *Circ Res.*, 101: 1075-7.
- Bahlmann F.H., De Groot K., Haller H., Fliser D. (2004) Erythropoietin: Is it more than correcting anaemia? *Nephrol. Dial. Transplant.*, 19: 20–2.
- Burghoff S., Gong X., Viethen C., Jacoby C., Flögel U., Bongardt S., Schorr A., Hippe A., Homey B., Schrader J. (2014) Growth and metastasis of B16-F10 melanoma cells is not critically dependent on host CD73 expression in mice. *BMC Cancer*, 14: 898.
- Castrop H., Huang Y., Hashimoto S., Mizel D., Hansen P., Theilig F., Bachmann S., Deng C., Briggs J., Schnermann J. (2004) Impairment of tubuloglomerular feedback regulation of GFR in ecto-5'-nucleotidase/CD73-deficient mice. *J Clin Invest.*, 114: 634-42.
- Colgan S.P., Eltzschig H.K., Eckle T., Thompson L.F. (2006) Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal.*, 2: 351–360.
- Eljaszewicz A., Wiese M., Helmin-Basa A., Jankowski M., Gackowska L., Kubiszewska I., Kaszewski W., Michalkiewicz J., Zegarski W. (2013) Collaborating with the enemy: function of macrophages in the development of neoplastic disease. *Mediators Inflamm.*, 2013: 1-11.
- Eroglu A., Canbolat O., Demirci S., Kocaoglu H., Eryavuz Y., Akgül H. (2000) Activities of adenosine deaminase and 5'-nucleotidase in cancerous and noncancerous human colorectal tissues. *Med Oncol.*, 17: 319-324.
- Fisher J.W., Brookins J. (2001) Adenosine A(2A) and A(2B) receptor activation of erythropoietin production. *Am J Physiol Renal Physiol.*, 281: F826-32.
- Fredholm B.B. (2014) Adenosine—a physiological or pathophysiological agent? *Mol Med.*, 92: 201–6.
- Fredholm B.B., Irenius E., Kull B., Schulte G. (2001) Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Biochem Pharmacol.*, 61: 443–8.
- Frolow M., Drozd A., Kowalewska A., Nizankowski R., Chlopicki S. (2015) Comprehensive assessment of vascular health in patients; towards endothelium-guided therapy. *Pharmacol Rep.*, 67: 786-92.
- Gao Z.W., Dong K., Zhang H.Z. (2014) The roles of CD73 in cancer. *Biomed Res Int.*, 2014: 460654.
- Gleiter C.H., Becker T., Wenzel J. (1997a) Erythropoietin production in healthy volunteers subjected to controlled hypobaric hypoxia: further evidence against a role for adenosine. *Br J Clin Pharmacol.*, 44: 203-5.
- Gleiter C.H., Brause M., Delabar U., Zebski H., Eckardt K.U. (1997b) Evidence against a major role of adenosine in oxygen-dependent regulation of erythropoietin in rats. *Kidney Int.*, 52: 338-44.
- Golino P., Crea F., Willerson J.T. (2002) How to study the effects of platelet aggregation and thrombosis on coronary vasomotion and their clinical relevance. *Ital Heart J.*, 3: 220-5.
- Hashikawa T., Takedachi M., Terakura M., Saho T., Yamada S., Thompson L.F., Shimabukuro Y., Murakami S. (2003) Involvement of CD73 (ecto-5'-nucleotidase) in adenosine generation by human gingival fibroblasts. *J Dent Res.*, 82: 888-92.
- Johnson D.W., Forman C., Vesey D.A. (2006) Novel renoprotective actions of erythropoietin: new uses for an old hormone. *Nephrology (Carlton)*, 11:306-12.
- Kroll K., Feigl E.O. (1985) Adenosine is unimportant in controlling coronary blood flow in unstressed dog hearts. *Am J Physiol.*, 249: H1176-87.
- Krüger K.H., Thompson L.F., Kaufmann M., Möller P. (1991) Expression of ecto-5'-nucleotidase (CD73) in normal mammary gland and in breast carcinoma. *Br J Cancer*, 63: 114-8.

- Kumar V., Sharma A. (2009) Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. *Eur J Pharmacol.*, 616: 7-15.
- Kwan K.M. (2002) Conditional alleles in mice: practical considerations for tissue-specific knockouts. *Genesis*, 32: 49–62.
- Le Hir M., Kaissling B. (1993) Distribution and regulation of renal ecto-5'-nucleotidase: implications for physiological functions of adenosine. *Am J Physiol.*, 264: F377-87.
- Moro S., Gao Z.G., Jacobson K.A., Spalluto G. (2006) Progress in the pursuit of therapeutic adenosine receptor antagonists. *Med Res Rev.*, 26: 131-59.
- Norrby K. (2006) In vivo models of angiogenesis. *J Cell Mol Med.*, 10: 588-612.
- Olsson R.A. (2004) Cardiovascular Ecto-5'-Nucleotidase. An End to 40 Years in the Wilderness? *Circ Res.*, 95: 752-753.
- Ostendorf T., Kunter U., Eitner F., Loos A., Regele H., Kerjaschki D., Henninger D.D., Janjic N., Floege J. (1999) VEGF(165) mediates glomerular endothelial repair. *J Clin Invest.*, 104:913-23.
- Patel L., Thaker A.. (2015) The effects of A2B receptor modulators on vascular endothelial growth factor and nitric oxide axis in chronic cyclosporine nephropathy. *J Pharmacol Pharmacother.*, 6:147-53.
- Pham C.T., MacIvor D.M., Hug B.A., Heusel J.W., Ley T.J. (1996) Long-range disruption of gene expression by a selectable marker cassette. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 13090-5.
- Raz A., McLella W.L., Hart I.R., Bucana C.D., Hoyer L.C., Sela B-A., Dragsten P., Fidler I.J. (1980) Cell surface properties of B16 melanoma variants with differing metastatic potential. *Cancer Res.*, 40: 1645-51.
- Resta R., Thompson L.F. (1997) T Cell Signalling Through CD73. *Cell Signal.*, 9: 131–139.
- Resta R., Yamashita Y., Thompson L.F. (1998) Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunol Rev.*, 161: 95-109.
- Ribatti D., Vacca A., Roccaro A.M., Crivellato E., Presta M. (2003) Erythropoietin as an angiogenic factor. *Eur J Clin Invest.*, 33: 891-6.
- Ryzhov S., Novitskiy S.V., Zaynagetdinov R., Goldstein A.E., Carbone D.P., Biaggioni I., Dikov M.M., Feokistov I. (2008) Host A(2B) adenosine receptors promote carcinoma growth. *Neoplasia*, 10: 987-95.
- Sadej R., Spychala J., Skladanowski A.C. (2006) Ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) is coexpressed with metastasis promoting antigens in human melanoma cells. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 25: 1119-23.
- San Martín R., Valladares D., Roa H., Troncoso E., Sobrevia L. (2009) Do adenosine receptors offer new therapeutic options for diabetic nephropathy? *Curr Vasc Pharmacol.*, 7: 450-9.
- Schnoor M., Alcaide P., Voisin M.B., van Buul J.D. (2015) Crossing the Vascular Wall: Common and Unique Mechanisms Exploited by Different Leukocyte Subsets during Extravasation. *Mediators Inflamm.*, 2015: 946509.
- Schroeder F., Gardiner J.M. (1984) Membrane lipids and enzymes of cultured high-and low-metastatic B16 melanoma variants. *Cancer Res.*, 44: 3262-9.
- Schulte G., Fredholm B.B. (2003) Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell Signal.*, 15: 813–27.
- Spychala J. (2000) Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacol Ther.*, 87: 161-73.
- Stagg J., Divisekera U., Duret H., Sparwasser T., Teng M.W., Darcy P.K., Smyth M.J. (2011) CD73-deficient mice have increased anti-tumor immunity and are resistant to experimental metastasis. *Cancer Res.*, 71: 2892-2900.
- Stochaj U., Dieckhoff J., Mollenhauer J., Cramer M., Mannherz H.G. (1989) Evidence for the direct interaction of chicken gizzard 5'-nucleotidase with laminin and fibronectin. *Biochim Biophys Acta*, 992: 385-92.
- Vaisitti T., Audrito V., Serra S., Bologna C., Brusa D., Malavasi F., Deaglio S. (2011) NAD⁺-metabolizing ecto-enzymes shape tumor-host interactions: the chronic lymphocytic leukemia model. *FEBS Lett.*, 585: 1514-20.
- Wang L., Tang S., Wang Y., Xu S., Yu J., Zhi X., Ou Z., Yang J., Zhou P., Shao Z. (2013) Ecto-5'-nucleotidase (CD73) promotes tumor angiogenesis. *Clin Exp Metastasis*, 30: 671-80.
- Yegutkin G.G., Marttila-Ichihara F., Karikoski M., Niemelä J., Laurila J.P., Elima K., Jalkanen S., Salmi M. (2011) Altered purinergic signaling in CD73-deficient mice inhibits tumor progression. *Eur J Immunol.*, 41: 1231–1241.
- Zhang J., Cao J., Ma S., Dong R., Meng W., Ying M., Weng Q., Chen .Z, Ma J., Fang Q., He Q., Yang B. (2014) Tumor hypoxia enhances Non-Small Cell Lung Cancer metastasis by selectively promoting macrophage M2 polarization through the activation of ERK signaling. *Oncotarget*, 5: 9664-77.
- Zhou X., Zhi X., Zhou P., Chen S., Zhao F., Shao Z., Ou Z., Yin L. (2007) Effects of ecto-5'-nucleotidase on human breast cancer cell growth *in vitro* and *in vivo*. *Oncol Rep.*, 17: 1341-6.
- Zimmermann B. (1992) 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem J.*, 285: 345-65.
- Zimmermann H., Zebisch M., Sträter N. (2012) Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal.*, 8: 437-502.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

Dorobek naukowy (szczegółowo w załączniku nr 4)

Łączna liczba publikacji pełnotekstowych (z wyłączeniem prac z cyklu habilitacyjnego): **15** (w tym pierwszy autor w **4** pracach, autor korespondencyjny w **3** pracach), suma IF: **20,299**, MNiSW: **181**,

w tym:

- przed doktoratem **3** publikacje o IF: **0,657**, MNiSW: -
- po doktoracie **12** publikacji (w tym pierwszy autor w **3** pracach, autor korespondencyjny w **3** pracach) o IF: **19,642**, MNiSW: **181**.

Cykl habilitacyjny: **5** publikacji (w tym pierwszy autor w **4** pracach, autor korespondencyjny w **3** pracach) o IF: **24,360**, MNiSW: **139**.

Sumaryczna liczba publikacji pełnotekstowych (z pracami z cyklu habilitacyjnego): **20** (w tym pierwszy autor w **8** pracach, autor korespondencyjny w **6** pracach), suma IF: **44,553**, MNiSW: **320**.

Łączna liczba streszczeń zjazdowych **31** (17 przed uzyskaniem stopnia doktora, 14 po uzyskaniu stopnia doktora): 19 na konferencjach krajowych i 12 na konferencjach zagranicznych.

Prace były cytowane **311** razy, a wyłączając autocytywania **300** razy. Indeks Hirsha wynosi **6** (dane z Web of Science z dnia 2016.03.15)(7 wg. Scopus z dnia 2016.03.15)

Projekty badawcze poza projektami wymienionymi w pkt. 4 autoreferatu:

1. KBN: 6 P207 121 06 (1994-1997) - Znaczenie czynnika nekrotyzującego nowotwory (TNF) oraz jego receptorów dla wzrostu i przerzutowania czerniaka Bomirskiego;
2. KBN: P04B 012 12 (1997-2000) - Aktywność immunomodulacyjna i przeciwnowotworowa sklonowanego i oczyszczonego czynnika martwicy nowotworu (TNF) szczura;
3. KBN: 6 P04A 017 21 (2001-2004) - Mechanizm synergistycznego przeciwnowotworowego działania czynnika martwicy nowotworu (TNF) i inhibitora angiogenezy TNP-470;
4. MNiSW: N401 073 32/1830 (2007-2010) - Analiza funkcji genu SASH1 jako markera rozwoju raka jelita grubego w oparciu o inaktywację ekspresji genu przy pomocy interferencji RNA w liniach komórkowych;
5. FNP: FOCUS 4/2008-F3/08/P/2012 (2009-2014) - Somatic mosaicism for copy number variation and epigenetic alterations as contributing casual factors in the initiation of primary and metastatic breast cancer;
6. NCN: N N405 024340 (2011-2014) - Porównawcza analiza proteomiczna hormonalnie czynnych guzów neuroendokrynych wspomaganą analizą QSRR;

Określenie roli produktu genu 28 bakteriofaga T4 w funkcjonowaniu i morfogenezie płytki podstawowej bakteriofaga.

Działalność naukową rozpoczęłam w latach 1994-95 podczas badań związanych z pracą magisterską realizowaną w Katedrze Mikrobiologii, Wydziału Biologii, Geografii i Oceanografii Uniwersytetu Gdańskiego pod opieką dr Józefa Nieradko. Tematem mojej pracy badawczej była charakterystyka roli produktu genu 28 w formowaniu płytki podstawowej bakteriofaga T4, której zarówno morfogeneza jak i skład nie były w tym czasie dobrze poznane. Bakteriofag T4 jest typowym fagiem litycznym używanym na początku XX wieku w terapii zakażeń bakteryjnych *E.coli* [Eaton MD et al., 1934; Sulakvelidze et al., 2001], który obecnie ponownie został wprowadzony do prób klinicznych [Bruttlin i Brüssow, 2005]. Płytki podstawowa faga jest

jego miejscem kontaktu z błoną bakteryjną i jej formowanie jest kluczowe w procesie zakażenia komórki bakteryjnej. Funkcja produktu genu 28 była w tym czasie mało poznana, sugerowano, że jest on elementem składowym płytki lub uczestniczy w procesie morfogenezy poprzez wprowadzanie pg 27 do płytki. W ramach mojej pracy sklonowałam oba geny, kodujące pg 27 i 28. Do określenia struktury i funkcji tych białek zastosowałam testy komplementacji *in vivo* z użyciem defektywnych mutantów bakteriofagowych, analizy degradacji białek *in vivo* i ich rozpuszczalności oraz wstępnie oczyściłam te białka stosując sączenie molekularne i elektroelucję. Badania wykazały, że pg 28 jest składnikiem płytki podstawowej oraz formuje kompleks z pg 27 (stosunek masowy 1:1). Uzyskanie przez mnie przeciwciał poliklonalnych przeciwko oczyszczoneму pg 28 pozwoliło na wykazanie, że efektywność zakażenia bakteriofaga T4 może zostać nimi zablokowana potwierdzając ważną rolę pg 28 w funkcji płytki podstawowej w procesie zakażenia. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w pracach:

- Nieradko J., Koszałka P., Krzywicka A. (1998) Characteristics of gene 28 product, the constituent of the central part of bacteriophage T4 baseplate”, *Acta Microbiol. Polon.*, 47(3): 243-52. IF: -; MNiSW: -.
- Nieradko J., Koszałka P. (1999) Evidence of interactions between gp27 and gp28 constituents of the central part of bacteriophage T4 baseplate. *Acta Microbiol. Polon.*, 48(3): 233-42. IF: -; MNiSW: -.

Za rok akademicki 1994/95 uzyskałam Nagrodę Rektora Uniwersytetu Gdańskiego I Stopnia przyznaną za wysokie wyniki w nauce i szczególne osiągnięcia w pracy naukowej.

Opracowanie metodyki oczyszczania TNF szczura, określenie jego skuteczności przy podaniu miejscowym oraz mechanizmu działania w nowym modelu czerniaka: przeszczepialnym czerniaku Bomirskiego chomika syryjskiego.

Bezpośrednio po obronie pracy magisterskiej w 1995 roku rozpoczęłam pracę na etacie naukowo - dydaktycznym na stanowisku asystenta w Katedrze Histologii i Immunologii Akademii Medycznej w Gdańsku. Rozprawę doktorską zatytułowaną „Aktywność immunomodulacyjna i przeciwnowotworowa sklonowanego i oczyszczonego czynnika martwicy nowotworu (TNF) szczura” przygotowaną pod opieką dr hab. Jacka Bigdy, obroniłam w maju 2000 roku, uzyskując stopień doktora nauk medycznych. Przedmiotem mojej pracy doktorskiej była kompleksowa analiza wpływu cytokiny, jaką jest czynnik martwicy nowotworu (TNF) na progresję czerniaka Bomirskiego w modelu chomika syryjskiego. Badania w tym temacie kontynuowałam jako asystent a następnie adiunkt (od 2004 roku) będąc od 2001 roku pracownikiem Katedry Biotechnologii Medycznej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG-GUMed z prof. dr hab. Jackiem Bigdą jako kierownikiem.

Czynnik martwicy nowotworu (TNF, TNF-alfa, kachektyna) jest cytokiną prozapalną używaną do wzmocnienia efektu chemioterapeutyków (np. melfalanu) w leczeniu czerniaków [Hoekstra et al., 2014]. Mechanizm działania TNF *in vivo* prowadzący do powstania martwicy krwotocznej guzów nie był w tym czasie dokładnie określony, ale były dane wskazujące, że może on wywierać działanie przeciwnowotworowe poprzez bezpośredni cytotoksyczny lub cytostatyczny wpływ na komórki nowotworowe, jako regulator odpowiedzi układu immunologicznego (przede wszystkim poprzez makrofagi lub komórki NK) a także poprzez wpływ na naczynia krwionośne guza [Aggarwal i Natarajan, 1996; Knippel et al., 1988]. Jednakże działanie przeciwnowotworowe TNF jest ograniczone jego silną toksycznością mogącą prowadzić do uszkodzenia wielu narządów a nawet do kacheksji czyli wyniszczenia organizmu w wyniku indukcji stanu zapalnego [Tracey et al., 1988]. Dlatego też stosowanie TNF w terapii kombinowanej z melfalanem jest ograniczone w klinice do izolowanej perfuzji kończyn lub wątroby (w przypadku nieusuwalnych operacyjnie nowotworów kończyn lub nowotworów/przerzutów do wątroby) ograniczającej systemowe oddziaływanie TNF na organizm [Grover i Alexander, 2004; Deroose et al., 2011]. W naszym projekcie podstawowym celem była więc analiza podania miejscowego TNF bezpośrednio do guza.

Na potrzeby analizy konieczne było opracowanie metodyki wydajnego oczyszczania TNF (5,4 mg z 1 litra hodowli bakteryjnej) o wysokiej aktywności biologicznej ($1,1 \times 10^8$ U/mg) i stopniu oczyszczenia (blisko

100%). Korzystając z ograniczonej specyficzności gatunkowej TNF sklonowałam szczurzy TNF do bakteryjnego systemu ekspresyjnego następnie oczyściłam za pomocą precypitacji różnicowej i sączenia chromatograficznego na kolumnach: hydroksypatytowej i jonowymiennej.

Kolejnym analizowanym aspektem było określenie czy podanie miejscowe może ograniczyć efekty toksyczne a jednocześnie utrzymać efekt przeciwnowotworowy tej cytokiny. Podany doguzowo preparat TNF w efektywny sposób hamował wzrost guza a także jego przerzuty do nerek a jednocześnie nie zmniejszał znacząco masy ciała zwierząt, objawu charakterystycznego dla kacheksji. Jednakże brak było wydłużenia czasu przeżycia. Analiza mechanizmu działania TNF w podaniu miejscowym wykazał bezpośredni efekt cytotoksyczny na komórki czerniaka stymulując ich śmierć apoptotyczną. Analizy na wyizolowanych limfocytach śledzionowych oraz makrofagach otrzewnowych wykazał zwiększoną aktywność makrofagów ale nie limfocytów u zwierząt niosących guz traktowanych TNF. Wykazano także wzrost poziomu cytokin prozapalnych w surowicy krwi tych zwierząt. Natomiast najważniejszym aspektem było zwiększenie częstości występowania martwicy krwotocznej w obrębie guza pod wpływem TNF oraz synergistyczny efekt TNP-470, inhibitora angiogenezy, na wzrost guza. Wskazuje to na wpływ TNF na łożysko naczyniowe guza.

Podsumowując, badania te wykazały, że miejscowe podanie TNF może być skutecznym podejściem terapeutycznym pozwalającym wyeliminować większość negatywnych efektów tej cytokiny prozapalnej na żywy organizm w trakcie terapii przeciwnowotworowej.

Uzyskane wyniki charakteryzujące się dużą powtarzalnością, pozwoliły na ustalenie, że amelanotyczna odmiana czerniaka Bomirskiego, szybko wzrastająca i dająca liczne przerzuty głównie do nerek i węzłów limfatycznych [Bomirski et al., 1988] jest dobrym modelem *in vivo* do analiz działania przeciwnowotworowego TNF. Zwiększyło to liczbę modeli dostępnych do analiz progresji czerniaka *in vivo*.

Uzyskane wyniki zostały opublikowane w pracach:

- Koszalka P., Breza H., Bigda J. (1998) Cloning, expression, purification of rat tumor necrosis factor and demonstration of its antitumor activity in Bomirski amelanotic melanoma. *Neoplasma*, 45(3): 162-168. IF: 0,657; MNiSW: - .
- Myśliwski A., Bigda J., Koszalka P., Szmít E. (2000) Synergistic effect of the angiogenesis inhibitor TNP-470 and tumor necrosis factor (TNF) on Bomirski Ab melanoma in hamsters. *Anticancer Res.*, 20(6B): 4643-7. IF: 1,331; MNiSW: 9.
- Koszalka P., Szmít E., Myśliwski A., Bigda J., "Anti-tumor action of tumor necrosis factor (TNF) against Bomirski Ab melanoma in hamsters. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 55(4): 267-79, 2007. IF: 1,689; MNiSW: 10

Wykazanie wysokiej skuteczności przeciwnowotworowej miejscowego podania syntetycznego analogu fumagilliny TNP-470 przy braku efekty cytotoksycznego na komórki śródbłónka w modelu czerniaka Bomirskiego chomika syryjskiego.

Po uzyskaniu stopnia doktora uczestniczyłam także w kontynuacji, we współpracy z Katedrą Histologii i Immunologii GUMed, badań nad przeciwnowotworowym działaniem inhibitora angiogenezy, jakim jest TNP-470 *in vivo* w modelu chomika syryjskiego. Mając szerokie doświadczenie z tym modelem badawczym oraz z pracą na zwierzętach uczestniczyłam w opracowaniu metodyki doświadczeń związanych z analizą okołoguzowego podania tego związku w terapii czerniaka oraz analizą uzyskanych danych. TNP-470, syntetyczny analog fumagilliny został wprowadzony w tym czasie do badań klinicznych, jako inhibitor angiogenezy, w terapii mięsaka Kaposiego, raka nerek, nowotworów mózgu, piersi, szyjki macicy oraz prostaty a także w terapii czerniaka. Jednakże w przypadku czerniaka nie udało się uzyskać remisji choroby nowotworowej [Bhargava et al., 1999; Kruger i Figg, 2000]. Wyniki uzyskane na modelu czerniaka Bomirskiego pozwoliły stwierdzić, że okołoguzowe podanie TNP-470 było skuteczniejsze od podania systemowego, hamując całkowicie wzrost guza oraz formowanie przerzutów i prowadząc do całkowitej remisji choroby nowotworowej.

Jednakże podanie systemowe TNP-470 w próbach klinicznych indukowało efekty toksyczne związane z zaburzeniami układu nerwowego (np. ataksja) a doświadczenia na zwierzętach wykazały, że wpływa także cytotoksycznie na komórki śródbłonna naczyniowego w zależności od dawki [Kruger i Figg, 2000]. Konieczna była więc analiza czy miejscowe podanie TNP-470 w dawce indukującej remisję czerniaka także może wywołać zaburzenia w strukturze śródbłonna naczyniowego naczyń krwionośnych tkanek szczególnie podatnych na uszkodzenia: płuc, nerek i wątroby. W doświadczeniach tych uczestniczyłam przede wszystkim w analizie histologicznej preparatów izolowanych tkanek, jako doświadczony już w tym czasie histolog. Analiza wykazała brak widocznych zmian w morfologii naczyń krwionośnych zarówno na poziomie mikroskopu świetlnego jak i elektronowego. Podanie okołoguzowe TNP-470 w dawce indukującej remisję nie ma więc znaczących efektów ubocznych.

W obecnej chwili angiogeneza, czyli formowanie nowych naczyń z już istniejących jest zwalidowana jako cel w terapii nowotworów. Jednakże nawet w przypadku inhibitorów angiogenezy dających dobre wyniki w terapii, modyfikacje prowadzące do podwyższenia ich efektywności czy zmniejszenia skutków ubocznych są ciągle pożądane [Jayson et al., 2016]. Wyniki podania miejscowego inhibitora angiogenezy jakim jest TNP-470 wskazuje, że taka zmiana podania może prowadzić jednocześnie do zwiększenia jego efektywności oraz zmniejszenia skutków ubocznych.

Wyniki zostały przedstawione w poniższych pracach:

- Myśliwski A., Koszałka P., Bigda J., Szmit E. (2002) Complete remission of Bomirski Ab amelanotic melanoma in hamsters treated with the angiogenesis inhibitor TNP-470. *Neoplasma*, 49(5): 319-22. IF: 0,679; MNiSW: 8.
- Myśliwski A., Kubasik-Juraniec J., Koszałka P., Szmit E. (2004) The effect of angiogenesis inhibitor TNP-470 on the blood vessels of the lungs, kidneys and livers of treated hamsters. *Folia Morphol.*, 63(1): 5-9. IF: -; MNiSW: -.

Potwierdzenie znaczącej roli adenozyiny generowanej przez CD73/ekto-5'-nukleotydazę w regulacji cewkowo-kłębuszkowego sprzężenia zwrotnego w nerkach.

Jednocześnie z kontynuacją badań w Zakładzie Biologii Komórki nad rolą TNF i TNP-470 w progresji czerniaka Bomirskiego rozpoczęłam nowy projekt badawczy przebywając w latach 2000-2003 na stażu naukowym jako asystent w Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie (Departament of Cardiovascular Physiology) na Uniwersytecie Heinricha-Heinego w Düsseldorfie, Niemcy, kierowanym przez prof. dr Jürgena Schradera. Uzyskany przeze mnie model badawczy myszy transgenicznej z knockoutem genu *cd73* [Koszalka et al., 2004] został wykorzystany w projekcie SFB612 „Molekulare Analyse kardiovaskulärer Funktionen und Funktionsstörungen” („Analiza molekularna funkcjonowania układu krwionośnego i jego zaburzeń funkcjonalnych”) (lata 2002-2012). Wyniki uzyskane w ramach podprojektu B6 w latach 2002-2004 („Rolle der intrazellulären und extrazellulären Adenosinbildung durch die 5'-Nukleotidase bei der Kontrolle von Blutfluß und Hämostase” - „Rola wzrostu wewnątrzkomórkowej i zewnątrzkomórkowej adenozyiny w wyniku działania 5'-nukleotydazy w kontroli krążenia krwi i hemostazy”) a także w ramach kontynuowanej współpracy przedstawione zostały w dwóch publikacjach ujętych w cyklu habilitacyjnym (4.1 i 4.2).

W ramach współpracy uczestniczyłam także w pracach nad wykorzystaniem myszy transgenicznej z knockoutem genu *cd73* w kontynuacji analizy roli CD73 w regulacji funkcji nerek, analizy zapoczątkowanej w publikacji 4.2 w cyklu habilitacyjnym. Jednakże w tym przypadku analiza funkcji nerek skierowana była nie na aspekty związane z funkcjonowaniem i rozwojem układu krwionośnego, takie jak produkcja erytropoetyny, ale na rolę CD73 w regulacji perfuzji nerek.

CD73 występuje w nerkach w kanalikach krętych proksymalnych i dystalnych, na komórkach mezangium kłębuszka oraz na fibroblastach tkanki śródmiąższowej. Generowana przez ten enzym adenozyina uznawana jest za mediator cewkowo-kłębuszkowego sprzężenia zwrotnego (TGF), mechanizmu regulującego działanie płamki gęstej będącej sensorem stężenia chlorku sodu w nerkach. Jako receptor regulujący ten proces zasugerowano receptor dla adenozyiny A₁ [Le Hir i Kaissling, 1993; Thomson et al., 2000]. Użycie naszego modelu badawczego do dokładnego pomiaru TGF poprzez mikroperfuzję kanalików

proksymalnych nerki potwierdziły rolę CD73 w regulacji tego procesu i wykazały zgodność z wcześniejszymi wynikami [Castrop et al., 2004] uzyskanymi na modelu mysim o odmiennym tle genetycznym (C57B L/6J vs NMRI strain) wygenerowanym odmienną metodą modyfikacji genetycznej. Dodatkowo, badania z użyciem antagonistów receptorów purynergicznego typu P2 zasugerowały, że regulacja przesączania kłębuszkowego przez CD73 nie jest ograniczona jedynie do jego roli w regulacji TGF ale także w regulacji akumulacji ATP w tym procesie. Jest to obecnie powszechnie uznawany model regulacji TGF przez CD73.

Badania te podkreśliły znaczącą rolę CD73 jako enzymu generującego adenozyne w regulacji funkcji nerek i potwierdziły zasadność użycia agonistów czy antagonistów receptorów dla jej regulacji. Wyniki przedstawiono w publikacji:

- Huang D.Y., Vallon V., Zimmermann H., Koszalka P., Schrader J., Osswald H. (2006) Ecto-5'-nucleotidase (cd73)-dependent and -independent generation of adenosine participates in the mediation of tubuloglomerular feedback in vivo. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 291: F282-8. IF: 4,199; MNiSW: 24.

Określenie dystrybucji aktywności katalitycznej enzymów błonowych uczestniczących w regulacji metabolizmu nukleotydów, w tym CD73/ekto-5'-nukleotydyazy, w mózgowiu gryzoni.

W ramach kontynuowanej współpracy model badawczy myszy transgenicznej z knockoutem genu *cd73* posłużył następnie także do dokładnej analizy występowania CD73 w mózgowiu. Analiza wykonana została we współpracy z laboratorium prof. dr med. Herberta Zimmermanna w Institute for Cell Biology and Neuroscience, Goethe University, Niemcy.

Ektonukleotydyazy, w tym CD73 zdają się pełnić ważną rolę w układzie nerwowym, zarówno w jego rozwoju, regulowaniu przeżycia komórek nerwowych, ich sygnalizacji, funkcji komórek glejowych [Zimmermann, 2006] jak i w funkcjonowaniu autonomicznego układu nerwowego [Cardoso et al., 2015]. Wcześniejsze analizy dystrybucji CD73 poprzez analizę histochemiczną jego aktywności oraz poprzez znakowanie immunohistochemiczne przeciwciałami anty-CD73 wykazały znaczące rozbieżności w dystrybucji tego enzymu w zależności od metody, wskazując na niedostateczną specyficzność przeciwciał lub reakcji enzymatycznej [Zimmermann, 1996]. Porównanie barwień histochemicznych preparatów uzyskanych od zwierząt dzikiego typu i z knockoutem genu *cd73* pozwoliły określić dokładną, szeroką dystrybucję ekspresji aktywnego enzymu na komórkach mózgowia. Całkowity brak aktywności CD73 na komórkach zwierząt z knockoutem pozwolił na wykluczenie tła aktywności enzymatycznej innych enzymów. W połączeniu z analizą ekspresji innych rodzin ektonukleotydyz uczestniczących w regulacji metabolizmu nukleotydów w układzie nerwowym pozwoliło to na uzyskanie po raz pierwszy pełnego obrazu dystrybucji ich aktywności katalitycznych w mózgowiu. Obraz ten jest ważny w kontynuacji badań nad rolą metabolizmu nukleotydów w funkcjonowaniu układu nerwowego. W pracy tej uczestniczyłam przede wszystkim jako doświadczony histolog. Jej wyniki zostały przedstawione w publikacji:

- Langer D., Hammer K., Koszalka P., Schrader J., Robson S., Zimmermann H.#. Distribution of ectonucleotidases in the rodent brain revisited. *Cell Tissue Res.*, 334(2): 199-217, 2008. IF: 2,740; MNiSW: 20.

Określenie korelacji między strukturą molekularną a działaniem przeciwnowotworowym peptydów przeciwbakteryjnych.

W roku 2005 w ramach współpracy z Katedrą Chemii Nieorganicznej Wydziału Farmacji Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego rozpoczęłam pracę nad analizą przeciwnowotworowego działania peptydów przeciwbakteryjnych. Współpraca ta została zapoczątkowana moją rolą jako promotora pracy dyplomowej Magdaleny Wejdy: „Cytotoksyczne właściwości wybranych peptydów przeciwbakteryjnych” (złożonej w 2005 roku) a następnie kontynuowana do 2013 roku.

Peptydy przeciwbakteryjne (AMPs) są częścią wrodzonego układu immunologicznego działając zarówno przeciwko bakteriom, grzybom, wirusom jak i komórkom nowotworowym. Większość z nich ma strukturę peptydu o długości 12-50 aminokwasów i wypadkowym ładunku dodatnim [Bulet et al., 2004]. Ich mechanizmem działania jest zaburzenie struktury błony poprzez formowanie amfipatycznych struktur formujących pory i prowadzących do lizy komórek, w sposób zależny jedynie od właściwości fizykochemicznych błon komórkowych. Część z nich może działać także poprzez mechanizmy wewnątrzkomórkowe wiążąc się do receptorów i np. stymulując produkcję TNF α albo przemieszczając się do wnętrza komórki i hamując np. replikację DNA. Na początku XX wieku już kilka z nich przechodziło próby kliniczne w leczeniu oportunistycznych zakażeń m.in. metycylinoopornymi szczepami *S. aureus* [Bulet et al., 2004; Reddy et al., 2004]. Ich mechanizm działania sprawił, że są one także selektywne w stosunku do komórek nowotworowych, których błony komórkowe mają zwykle podwyższony ładunek ujemny w wyniku zmian w składzie fosfolipidowym i zmian w glikozylacji. Jednakże, ze względu na znaczną różnorodność w budowie peptydów, zarówno w składzie aminokwasowym (bogate w histydyny, tryptofan, bez cysteiny itp.) jak i formowaniu struktur przestrzennych (α -helisy, β -pętle, β -kartki i in.) problematyczne było określenie, dlaczego niektóre peptydy wywierają efekt przeciwnowotworowy a inne nie [Hoskin i Ramamoorthy, 2008].

Jako zadanie badawcze postawiliśmy sobie najpierw określenie cytotoksyczności grupy sześciu peptydów o różnorodnej budowie na jednej linii komórek nowotworowych a potem powiązanie ich działania z ich strukturą. Jako model badawczy została użyta linia U937 ludzkiej białaczki histiocytarnej powszechnie używanej w analizach cytotoksyczności TNF. Używając testów cytotoksycznych analizowaliśmy bezpośredni efekt peptydów na integralność błony komórkowej a także pośredni na komórki nowotworowe analizując ich wpływ na uwalnianie TNF α . Udało nam się określić, że efekt cytotoksyczny na komórki U937 wywierany był jedynie bezpośrednio poprzez zaburzenie ciągłości błony komórkowej a peptydy działające poprzez inne mechanizmy jak Buforyna 2 nie wywierały efekty cytotoksycznego. Efekt ten zależny był nie od specyficznych motywów strukturalnych obecnych w niektórych analizowanych peptydach, ale od ich długości wpływającej na formowanie struktur porów przezbłonowych.

Określenie zależności między strukturą a funkcją przeciwnowotworową peptydów umożliwia ich nie tylko lepsze wyselekcjonowanie tych o aktywności przeciwnowotworowej spośród już ponad tysiąca poznanych peptydów, ale także określenie jakie modyfikacje mogą posłużyć optymalizacji ich właściwości w terapii nowotworów z użyciem peptydów przeciwnowotworowych, nowej klasy związków terapeutycznych [Oelkrug et al., 2015].

Wyniki zostały przedstawione w poniższej pracy:

- Kozzałka P., Kamysz E., Wejda M., Kamysz W., Bigda J. (2011) Antitumor activity of antimicrobial peptides against U937 histiocytic cell line. Acta Biochim Pol. 58(1): 111-7. IF: 1,491; MNiSW: 15

Stworzenie wektora docelowego służącego do modyfikacji genomu w celu uzyskania nowego modelu myszy transgenicznej z nadekspresją CD73 w śródbłonku naczyńnowym.

Ze względu na doświadczenie w opracowywaniu wektorów docelowych służących do modyfikacji genomu w ramach kontynuowanej współpracy z laboratorium prof. dr Jürgena Schradera (Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie/Departament of Cardiovascular Physiology na Uniwersytecie Heinricha-Heinego w Düsseldorfie, Niemcy) uczestniczyłam w stworzeniu wektora do nadekspresji CD73 spod promotora specyficznego dla śródbłonka naczyńnowego. Narzędzie to było przygotowywane dla podprojektu B6: „Rolle der cd73/ekto-5'-Nukleotidase in der extrazellulären Nukleotidkaskade bei akuter und chronischer Entzündung, Hypoxie und Angiogenese” („Rola cd73/ekto-5'-nukleotydyazy w zewnątrzkomórkowej kaskadzie nukleotydydów w trakcie ostrego i chronicznego zapalenia, hypoksji i angiogenezy”) w ramach projektu SFB612 na lata 2008-2012.

Do plazmidu pBluescript zostały wklonowane: promotor Tie2 do tkankowo-specyficznej ekspresji w komórkach śródbłonna naczyniowego, cDNA dla ludzkiego genu *cd73* oraz fragment genu β -globiny z sekwencją intronową i sekwencją poliA a także sekwencja enhancera dla promotora Tie2. Możliwość wycięcia z plazmidu zestawu sekwencji od promotora do enhancera włącznie jednym enzymem umożliwia użycie tego konstrukt do modyfikacji komórek za pomocą niehomologicznej rekombinacji. Wektor ten ulegał ekspresji w komórkach śródbłonna naczyniowego wskazując na użyteczność stworzonego narzędzia. Wyniki zostały przedstawione w pracy magisterskiej mgr Moniki Kurgan (teraz Gołuńskiej) (złożona w 2010 roku) pt.: "Construction of vectors for ecto-5' nucleotidase overexpression and preliminary expression".

Wektor ten po wprowadzeniu poprzez mikroiniekcję do przedjadrza zapłodnionej komórki jajowej ulegnie wbudowaniu do genomu za pomocą niehomologicznej rekombinacji i ekspresji. Może więc posłużyć do stworzenia nowego modelu myszy transgenicznej z nadekspresją CD73 w komórkach śródbłonna naczyniowego. Ten model badawczy może posłużyć do oceny roli CD73 w funkcjonowaniu układu krwionośnego w warunkach jego zwiększonej ekspresji, zjawiska charakterystycznego dla warunków patologicznych takich jak np. niedotlenienie czy stan zapalny.

Wykrycie nowych potencjalnych biomarkerów do diagnostyki guzów neuroendokrynych oraz opracowanie metodyki związanej z analizą ich sekretomu.

Nowotwory neuroendokryne (NET) są grupą rzadkich i słabo opisanych nowotworów wywodzących się z komórek endokrynych rozproszonych w całym organizmie człowieka. Ze względu na ich olbrzymią różnorodność pod względem pochodzenia, zróżnicowania, tempa wzrostu jak i cech histologicznych i biochemicznych ich diagnostyka jest niezwykle utrudniona wymagająca skomplikowanych metod biochemicznych i obrazowych [Klimstra et al., 2015]. Używane obecnie markery analizowane we krwi lub moczu pacjentów są w większości przypadków niedostatecznie specyficzne w stosunku do typu nowotworu a także obecne w warunkach fizjologicznych we krwi co utrudnia dostatecznie wczesne rozpoznanie nowotworu [Lamberts et al., 2001; de Herder, 2007]. Badania przeprowadzone przez Katedrę Chemii Farmaceutycznej i Katedrę Endokrynologii i Chorób Wewnętrznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego było więc skierowane na znalezienie nowych potencjalnych markerów zarówno w moczu pacjentów jak i w sekretomie znad hodowli pierwotnych NET. W badaniach tych uczestniczyłam ze względu na moje doświadczenie w analizie elektroforetycznej i chromatograficznej białek, ale przede wszystkim z uwagi na szerokie doświadczenie w pracy w hodowli komórek, w tym pracy z hodowlami pierwotnymi guzów nowotworowych a także w hodowli na matrycach 3D.

W tym projekcie po raz pierwszy zastosowano do diagnostyki NET analizę profilu hormonów sterydowych w moczu pacjentów. W rezultacie wykazano korelację między profilem glikokortykosteroidów (kortyzolu i kortyzonu) a występowaniem NET. W tym celu opracowano także nową, bardzo czułą metodykę jednoczesnego pomiaru sześciu hormonów sterydowych za pomocą chromatografii cieczowej.

Jednocześnie przeprowadzana była analiza porównawcza składu sekretomu znad nowotworowych hodowli pierwotnych hormonalnie czynnych guzów neuroendokrynych (NET) w poszukiwaniu specyficznych sygnatur białkowych charakterystycznych dla produktów fenotypu wydzielającego. Materiał do badań stanowiły próbki tkankowe pobrane od pacjentów, które uzyskano w trakcie operacyjnego zabiegu usunięcia guza NET. Do wydajnej analizy fenotypu wydzielniczego konieczne było opracowanie nie tylko skutecznej techniki izolacji komórek z prób tkankowych, ale także hodowli ich w warunkach indukujących polaryzację komórek i ich aktywność wydzielniczą. W tym celu konieczne okazało się hodowanie ich na podłożu z substancji podstawowej mięsaka EHS tzw. Matrigelu. Pożywka bezsurowicza stosowana dla linii kilku dostępnych obecnie linii NET [Pfragner et al., 2004] okazała się wystarczająca dla utrzymania żywotności wyizolowanych komórek jednakże niewystarczająca dla stymulacji ich pełnej aktywności wydzielniczej. Jednakże analiza sekretomu pozwoliła na wskazanie 14 nowych potencjalnych markerów.

- Plenis A., Miękus N., Olędzka I., Bączek T., Lewczuk A., Woźniak Z., Koszałka P., Seroczyńska B., Skokowski J. (2013) Chemometric Evaluation of Urinary Steroid Hormone Levels as Potential Biomarkers of Neuroendocrine Tumors. *Molecules* 18(10): 12857-76. IF: 2,095; MNiSW: 30
- Miękus N, Olędzka I, Plenis A, Woźniak Z, Lewczuk A, Koszałka P., Seroczyńska B, Bączek T. (2015) Gel electrophoretic separation of proteins from cultured neuroendocrine tumor cell lines. *Mol Med Rep.* 11(2): 1407-15. IF: 1,554; MNiSW: 20

Bibliografia:

- Aggarwal B.B. and Natarajan K. (1996) Tumor necrosis factors. Development during the last decade. *Eur. Cytokine Netw.*, 7: 93–124.
- Bhargava P., Marshall J.L., Rizvi N., Dahut W., Yoe J., Figuera M., Phipps K., Ong V.S., Kato A., Hawkins M.J. (1999) A Phase I and pharmacokinetic study of TNP-470 administered weekly to patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res.*, 5: 1989-95.
- Bomirski A., Słomiński A., Bigda J. (1988) The natural history of a family of transplantable melanomas in hamsters. *Cancer Metastasis Rev.*, 7: 95-118.
- Bruttin A., Brüssow H. (2005) Human volunteers receiving Escherichia coli phage T4 orally: a safety test of phage therapy. *Antimicrob Agents Chemother.*, 49: 2874-8.
- Bulet P., Stöcklin R., Menin L. (2004) Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev.*, 198: 169–184.
- Cardoso A.M., Schetinger M.R., Correia-de-Sá P., Sévigny J. (2015) Impact of ectonucleotidases in autonomic nervous functions. *Auton Neurosci.*, 191: 25-38.
- Castrop H., Huang Y., Hashimoto S., Mizel D., Hansen P., Theilig F., Bachmann S., Deng C., Briggs J., Schnermann J. (2004) Impairment of tubuloglomerular feedback regulation of GFR in ecto-5'-nucleotidase/CD73-deficient mice. *J Clin Invest.*, 114: 634-42.
- de Herder W.W. (2007) Biochemistry of neuroendocrine tumours. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.*, 21: 33-41.
- Deroose J.P., Eggermont A.M., van Geel A.N., Verhoef C. (2011) Isolated limb perfusion for melanoma in-transit metastases: developments in recent years and the role of tumor necrosis factor alpha. *Curr Opin Oncol.*, 23: 183-8. doi: 10.1097/CCO.0b013e3283424dbc.
- Eaton M.D., Bayne-Jones S. (1934) Bacteriophage therapy. Review of the principles and results of the use of bacteriophage in the treatment of infections. *JAMA*, 23: 1769–939.
- Grover A., Alexander H.R. Jr. (2004) The past decade of experience with isolated hepatic perfusion. *Oncologist*, 9: 653-64.
- Hoekstra H.J., Veerman K., van Ginkel R.J. (2014) Isolated limb perfusion for in-transit melanoma metastases: melphalan or TNF-melphalan perfusion? *J Surg Oncol.*, 109: 338-47.
- Hoskin D.W., Ramamoorthy A. (2008) Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta*, 1778: 357-75.
- Ijzermans J.N., Scheringa M., van der Schelling G.P., Geerling R.A., Marquet R.L., Jeekel J. (1992) Injection of recombinant tumor necrosis factor directly into liver metastases: An experimental and clinical approach. *Clin. Exp. Metastasis*, 10: 91-7.
- Jayson G.C., Kerbel R., Ellis L.M., Harris A.L. (2016) Antiangiogenic therapy in oncology: current status and future directions. *Lancet*, pii: S0140-6736(15)01088-0.
- Klimstra D.S., Beltran H., Lilenbaum R., Bergsland E. (2015) The spectrum of neuroendocrine tumors: histologic classification, unique features and areas of overlap. W: 2015 Educational Book, Am Soc Clin Oncol Educ Book., str. 92-103.
- Knippel E., Rychly J., Schulze H. A., Ringel B., Krygier- Stojalowska A. (1988) Effect of recombinant human tumor necrosis factor on tumor and spleen in mice. *Int. J. Cancer*, 42: 395–9.
- Kruger E.A., Figg W.D. (2000) TNP-470: an angiogenesis inhibitor in clinical development for cancer. *Expert Opin Investig Drugs.*, 9: 1383-96.
- Lamberts S.W., Hofland L.J., Nobels F.R. (2001) Neuroendocrine tumor markers. *Front Neuroendocrinol.*, 22: 309-39.
- Le Hir M., Kaissling B. (1993) Distribution and regulation of renal ecto-5'-nucleotidase: implications for physiological functions of adenosine. *Am J Physiol.*, 264: F377-87.
- Neary J.T., Zimmermann H. (2009) Trophic functions of nucleotides in the central nervous system. *Trends Neurosci.*, 32: 189-98.

- Oelkrug C., Hartke M., Schubert A. (2015) Mode of action of anticancer peptides (ACPs) from amphibian origin. *Anticancer Res.*, 35: 635-43.
- Pfragner R., Behmel A., Ingolic E., Wirnsberger G.H. (2004) Culture of human neuroendocrine tumor cells. W: *Culture of Human Tumor Cells (Culture of Specialized Cells)*, Ed.: Pfragner R. i Freshney R.I., John Wiley & Sons Inc., str. 373-404.
- Reddy K.V.R., Yedery R.D., Aranha C. (2004) Antimicrobial peptides: premises and promises, *Int J Antimicrob Agents*, 24: 536-547.
- Sakuma T., Barry M.A., Ikeda Y. (2012) Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochem J.*, 443: 603-18.
- Sulakvelidze A., Alavidze Z., Morris J.G.Jr. (2001) Bacteriophage therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45: 649-59.
- Thomson S., Bao D., Deng A., Vallon V. (2000) Adenosine formed by 5'-nucleotidase mediates tubuloglomerular feedback. *J Clin Invest.*, 106: 289-98.
- Tracey K.J., Wei H., Manogue K.R., Fong Y., Hesse D.G., Nguyen H.T., Kuo G.C., Beutler B., Cotran R.S., Cerami A., Lowry S.F. (1988) Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia, and inflammation. *J. Exp. Med.*, 167: 1211-27.
- Williams N.S., Gaynor R.B., Scoggin S., Verma U., Gokaslan T., Simmang C., Fleming J., Tavana D., Frenkel E., Becerra C. (2003) Identification and validation of genes involved in the pathogenesis of colorectal cancer using cDNA microarrays and RNA interference. *Clin Cancer Res.*, 9: 931-46.
- Zimmermann H. (1996) Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Prog Neurobiol.*, 49: 589-618.
- Zimmermann H. (2006) Ectonucleotidases in the nervous system. *Novartis Found Symp.*, 276: 113-28.

Patrycja Koszałka
Gdańsk 23.03.2016