

Zakład Chemii Leków
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

dr n. farm. Arkadiusz Surażyński

**Dokumentacja o wszczęcie postępowania habilitacyjnego
w dziedzinie nauk farmaceutycznych**

Załącznik 2

AUTOREFERAT

Białystok 2013

DANE OSOBOWE

Imię i nazwisko: **Arkadiusz Surazyński**

Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

- Doktor nauk farmaceutycznych: Śląska Akademia Medyczna, Sosnowiec, 2002, „Mechanizm inhibitorowego działania kwasu acetylosalicylowego na metabolizm kolagenu w fibroblastach skóry ludzkiej”
- Dyplom specjalizacji pierwszego stopnia z farmacji aptecznej: Białystok, 2001.
- Dyplom magistra farmacji: Akademia Medyczna w Białymstoku, 1998, „Wpływ agonistów receptorów β_3 adrenergicznych na układ krążenia szczura”

Zatrudnienie

1998 – 2006	Asystent, Zakład Chemii i Analizy Leków, Akademia Medyczna w Białymstoku
2003 - 2005	Staż naukowy, National Cancer Institute, Frederick, MD, USA
2006	2 miesięczna misja naukowa w National Cancer Institute, Frederick, MD, USA
2006 - 2011	Adiunkt, Zakład Chemii i Analizy Leków, Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
Od 2011	Adiunkt, Zakład Chemii Leków, Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

OSIĄGNIĘCIA OKREŚLONE W 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, Z PÓŹN. ZM.)

Tytuł osiągnięcia naukowego:

Identyfikacja zależnych od prolidazy wewnątrzkomórkowych szlaków metabolicznych stanowiących molekularne cele eksperymentalnej farmakoterapii zapalenia i procesu nowotworowego.

Przedmiotem mojego zainteresowania badawczego jest ocena mechanizmów zakłócenia szlaków sygnałowych w przebiegu eksperymentalnych zaburzeń metabolizmu komórkowego, identyfikacja molekularnych celów potencjalnej farmakoterapii oraz ocena mechanizmów działania leków.

Z mojego dorobku naukowego wyodrębniłem siedem prac zawierających wyniki badań nad rolą prolidazy w regulacji szlaków metabolicznych w prawidłowych i patologicznych liniach komórkowych oraz identyfikacją potencjalnych punktów uchwytu farmakoterapeutycznej interwencji:

1. **Surazynski A**, Liu Y, Milyk W, Phang JM. Nitric oxide regulates prolidase activity by serine/threonine phosphorylation. 2005. Journal of Cellular Biochemistry. 1;96(5):1086-94.
2. **Surazynski A**, Donald SP, Cooper SK, Whiteside MA, Salnikow K, Liu Y, Phang JM. Extracellular matrix and HIF-1 signaling: the role of prolidase. 2008. International Journal of Cancer. 15;122(6):1435-40.
3. **Surazynski A**, Milyk W, Palka J, Phang JM. Prolidase-dependent regulation of collagen biosynthesis. 2008. Amino Acids. 35(4):731-8.
4. **Surazynski A.**, Milyk W., Prokop I., Palka J. Prolidase-dependent regulation of TGF β and TGF β receptor expressions in human skin fibroblasts. 2010. European Journal of Pharmacology. 649, 115-9.
5. **Surazyński A**, Jarząbek K, Milyk W, Wołczyński S, Pałka J. Estrogen-dependent regulation of PPAR-gamma signaling on collagen biosynthesis in adenocarcinoma endometrial cells. 2009. Neoplasma; 56, 5, s.448-454

6. Kocięcka B, **Surazyński A**, Mityk W, Pałka J. The effect of Telmisartan on collagen biosynthesis depends on the status of estrogen activation in breast cancer cells. *European Journal of Pharmacology* 2010; 628, s. 51-56
 7. **Surazyński A**, Mityk W, Prokop I, Pałka J. The effect of estrogen on prolidase – dependent regulation of HIF-1 α expression in breast cancer cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2013; DOI 10.1007/s11010-013-1623-9 (*online*).
- Łączny **Impact Factor** tych prac wynosi: **21,18**. Punktacja **MNiSW**: **166**.

Przedmiotem badań stanowiących treść wyodrębnionych publikacji jest ocena molekularnego mechanizmu regulacji szlaków wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału zależnych od aktywności prolidazy.

Prolidaza (peptydaza D, imidopeptydaza, E.C. 3.4.13.9) jest cytoplazmatyczną egzo-peptydazą, katalizującą hydrolizę imidodipeptydów, w których C-końcowa prolina lub hydroksypolina związana jest za pośrednictwem III-rzędowego azotu z grupą karbonylową poprzedzającego ją aminokwasu z wolną grupą aminową. Imidodipeptydy pochodzą z wewnątrzkomórkowej degradacji białek endogennych, zwłaszcza kolagenu, a także innych białek zawierających prolinę. Ulegają one degradacji do wolnych aminokwasów przy udziale cytoplazmatycznej prolidazy. Soki trawienne przewodu pokarmowego nie zawierają bowiem enzymów zdolnych do trawienia III-rzędowego wiązania imidowego. Prolidaza jest metaloproteinazą, bowiem do pełnej aktywności enzymatycznej wymaga obecności jonów manganu.

Prolidaza, katalizuje końcowy etap hydrolizy białek zawierających prolinę lub hydroksyprolinę. Największa ilość takich białek występuje w macierzy pozakomórkowej (ECM). Funkcja prolidazy polega na reutilizacji proliny do syntezy białek, zwłaszcza kolagenu. Kolagen, stanowiący około jedną trzecią wszystkich białek organizmu ludzkiego jest polipeptydem zawierającym największą liczbę wiązań imidowych spośród wszystkich znanych białek. Występują one głównie jako glicylo-prolina. W łańcuch α_1 kolagenu typu I (235 aminokwasów) ten dublet występuje 25 razy. W innych białkach prolina rzadko występuje w sąsiedztwie glicyny. Istnieje szereg dowodów udziału prolidazy w regulacji syntezy kolagenu i innych białek zawierających prolinę.

Kolagen jest niezbędnym składnikiem tkanki łącznej, zapewniającym jej integralność i prawidłową funkcję. Jest bowiem nie tylko składnikiem strukturalnym ECM stanowiącym

element podporowy tkanek, ale pełni ważną rolę w regulacji metabolizmu komórkowego jako ligand niektórych receptorów integrynowych. Za pośrednictwem tych receptorów indukuje szlaki sygnałowe regulujące ekspresję genów, różnicowanie, wzrost i wiele innych funkcji komórek.

Pobudzenie receptora integrynowego przez ligand, np.: kolagen, indukuje fosforylację białka FAK i zmianę jego konformacji pozwalającą na interakcję z regionami SH2 kinazy Src. Zjawisko to pozwala na interakcję kinazy FAK z białkiem adaptorowym Grb-2 oraz fosforylację kinazy Shc. Zaktywowana w ten sposób kinaza Shc wiąże się z białkiem Grb-2. Białko Grb-2 jest białkiem adaptorowym, bogatym w domeny SH2, które warunkują wiązanie z bogatymi w prolinę obszarami białka SOS (będącym białkiem wymieniającym nukleotydy guanidynowe), co powoduje translokację białka SOS do błony komórkowej i zakotwiczenie tego białka przy cytoplazmatycznej powierzchni błony. Tutaj białko SOS łączy się z zakotwiczonym przy cytoplazmatycznej powierzchni błony komórkowej białkiem Ras. Zaktywowane białko Ras łączy się z białkiem Raf, które po zaktywowaniu powoduje fosforylację MAP-kinaz. MAP-kinazy ulegają translokacji do jądra komórkowego, gdzie aktywują szereg czynników transkrypcyjnych np.: (NFκB, STAT, p53) regulujących ekspresję tzw. genów wczesnej odpowiedzi, kodujących białka uczestniczące w procesach wzrostu i różnicowania komórek. Nasunęło to przypuszczenie, że prolidaza poprzez udział w metabolizmie kolagenu - liganda receptorów integrynowych, wpływa na regulację metabolizmu komórkowego.

Potwierdzeniem udziału prolidazy w regulacji wielu funkcji fizjologicznych organizmu są objawy kliniczne genetycznego niedoboru prolidazy. Należą do nich: owrzodzenie podudzi i towarzyszące im trudno gojące się rany, schorzenia skóry związane z zaburzeniami równowagi pomiędzy syntezą a degradacją kolagenu, częste infekcje z powodu niedoborów immunologicznych, będące następstwem zakłóconej biosyntezy bogatych w prolinę immunoglobulin lub/i C₁q czy upośledzenie umysłowe, którego przyczyną może być obniżenie stężenia L-proliny w ośrodkowym układzie nerwowym. Wiadomo bowiem, że L-prolina odgrywa ważną rolę w pobudzaniu neuronów glutaminergicznych. Niedobór prolidazy obniża stężenie L-proliny w krążeniu, co może zakłócać funkcję tych neuronów.

Powyższe wyniki badań skłoniły mnie do poszukiwania wewnątrzkomórkowych mechanizmów regulacji aktywności prolidazy. W toku badań wykazałem, że aktywność prolidazy regulowana jest poprzez proces fosforylacji (1). Wykazałem, że fosforylacja enzymu

zachodzi pod wpływem sygnału generowanego przez receptory (m.in.: integrynowe i IGF-IR), a także pod wpływem mediatorów zapalenia np. tlenku azotu. Wykazałem, że zarówno tlenek azotu pochodzący z donorów tlenku azotu (DETA/NO i SIN-1) jak i w wyniku nadekspresji wewnątrzkomórkowej syntazy tlenku azotu (transfekcja komórek iNOS) powoduje wzrost aktywności prolidazy. Zjawisko to nie było skorelowane ze wzrostem ekspresji tego enzymu, co sugeruje post-translacyjny mechanizm regulacji aktywności prolidazy.

Fosforylacja białek jest powszechnie występującym mechanizmem regulacji aktywności enzymów. Prolidaza posiada w strukturze I-rzędowej szereg reszt serylo-treonylowych, które stanowią potencjalne miejsce fosforylacji. W toku badań wykazałem, że prolidaza ulega fosforylacji na resztach serylo-treonylowych, a tlenek azotu powoduje wzrost aktywności prolidazy skorelowany ze wzrostem ekspresji fosforylowanej formy prolidazy bez wpływu na zawartość białka enzymatycznego. Proces fosforylacji prolidazy, oprócz wyjaśnienia mechanizmu regulacji jej aktywności enzymatycznej, pozwala włączyć prolidazę do szeregu białek uczestniczących w procesach wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału regulującego metabolizm i wzrost komórek (1).

Wysokie stężenie tlenku azotu powoduje wzrost syntezy kolagenu, szczególnie w czasie gojenia ran. Odkrycie stymulującego wpływu tlenku azotu na aktywność prolidazy może tłumaczyć mechanizm tego zjawiska. Poparciem tej tezy jest fakt, iż klinicznym objawem niedoboru prolidazy są zaburzenia w procesie gojenia ran. Odkrycie, że prolidaza jest enzymem regulowanym przez tlenek azotu pozwala włączyć ją w szlak przemian metabolicznych związanych z gojeniem ran. Procesowi temu towarzyszy przebudowa ECM (pobudzenie obrotu kolagenu) oraz proces angiogenezy (pobudzenie genów pro-angiogennych).

Rola tlenku azotu (cząsteczki uczestniczącej w wielu procesach fizjologicznych i patologicznych, między innymi w procesie zapalenia i angiogenezy) w regulacji prolidazy skłoniła mnie do badań w kierunku powiązania prolidazy z procesem angiogenezy. W tym celu po raz pierwszy skonstruowałem plazmid dla prolidazy i otrzymałem komórki z podwyższoną ekspresją tego enzymu. W komórkach stransfekowanych zauważyłem znaczny wzrost ekspresji czynnika stymulującego angiogenezę: VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*, czynnik wzrostu komórek śródbłonnka naczyńniowego) oraz Glut – 1 (transportera glukozy) odpowiedzialnego za utrzymanie homeostazy komórkowej w warunkach między

innymi niedotlenienia (2). Dalsze badania wykazały, że prolidaza uczestniczy w modulacji ekspresji czynnika transkrypcyjnego HIF-1 α (*Hypoxia Inducible Factor*; czynnik indukowany hipoksją). Czynnik ten odpowiedzialny jest za regulację ekspresji wielu genów uczestniczących w procesach proliferacji i apoptozy komórek oraz wielu szlaków onkogennych. Wykorzystując test ekspresji lucyferazy wykryłem, że wraz ze wzrostem aktywności prolidazy dochodzi do wzrostu ekspresji fragmentu HRE (*Hypoxia Response Element*) w DNA, co tłumaczy podwyższenie ekspresji VEGF i GLUT-1 w komórkach stransfekowanych wektorem prolidazy. Podobny efekt zaobserwowałem po dodaniu do komórek produktów aktywności prolidazy: proliny i hydroksyproliny. W tym przypadku również dochodzi do wzrostu ekspresji fragmentu HRE, co wskazuje, że za opisane efekty odpowiedzialna jest enzymatyczna funkcja prolidazy i wzrost stężenia proliny lub hydroksyproliny wewnątrz komórki (2).

Stabilność i aktywność HIF-1 α regulowana jest przez różne post-translacyjne modyfikacje, np. acetylacja, hydroksylacja, fosforylacja. W warunkach prawidłowego ciśnienia parcjalego tlenu w tkankach (normoksji), HIF-1 α ulega proteosomalnej degradacji indukowanej poprzez produkt genu supresorowego pVHL. W tych warunkach (normoksji) czynnikiem włączającym proces degradacji jest hydroksylacja segmentu polipeptydowego zwanego ODD (Oxygen-dependent Degradation Domain). W warunkach hipoksji, proces hydroksylacji ODD nie zachodzi, HIF-1 α nie ulega degradacji, natomiast ulega interakcji z koaktywatorem p300/CBP, który moduluje jego aktywność transkrypcyjną. Mechanizm ten ilustruje schemat 1. Wykorzystując test lucyferazy CMV-Luc-ODD, jako zastępczego substratu hydroksylacji segmentu polipeptydowego ODD, wykazałem, że wraz ze wzrostem aktywności prolidazy zachodzi upośledzenie proteosomalnej degradacji tego czynnika, co bezpośrednio przekłada się na stabilność i wzrost ekspresji HIF-1 α w komórce. W tym przypadku, podobnie jak w poprzednim doświadczeniu, dodanie do komórek produktów aktywności prolidazy: proliny lub hydroksyproliny wywiera podobny efekt jak podwyższenie aktywności prolidazy. Zahamowanie proteosomalnej degradacji HIF-1 α , a co za tym idzie zwiększenie ilości tego czynnika i translokacja do jądra komórkowego skutkuje pobudzeniem ekspresji genów i w konsekwencji syntezy białek potrzebnych do utrzymania homeostazy tkankowej. Pobudzane geny to przede wszystkim czynniki zaangażowane w zapewnienie komórkom optymalnej ilości tlenu poprzez angiogenezę (VEGF, VEGFR-1), erytropoezę (EPO), dostarczenie żelaza (transferyna), białka metabolizmu beztlenowego (enzymy glikolityczne), transportery

glukozy (GLUT-1 i -3), czynniki wzrostu (TGF- α , IGF-2) oraz inne związane np.: z inwazyjnością (katepsyna D, MMP-2, ID2). Bardzo interesującym zjawiskiem jest fakt, że za obniżenie degradacji HIF-1 α nie jest odpowiedzialna prolidaza jako enzym, lecz produkty jej aktywności – prolina a także hydroksyprolina (2). Odkrycie tego zjawiska może tłumaczyć zależność między aktywnością prolidazy a inwazyjnością komórek nowotworowych. Z literatury wiadomo bowiem, że komórki nowotworowe z wysoką aktywnością prolidazy wykazują wysoką inwazyjność. Po raz pierwszy przedstawiłem dowody, że za aktywację i ekspresję genów zależnych od tego czynnika transkrypcyjnego odpowiedzialne są aminokwasy uwalniane w procesie katalizowanym przez prolidazę – prolina i hydroksyprolina (2). Odkrycie to uważam za swoje największe osiągnięcie naukowe. Mechanizm tego zjawiska ilustruje schemat 2.

W dalszych badaniach nad regulacyjną rolą aminokwasów pochodzących z produktów reakcji katalizowanej przez prolidazę wskazałem na bardzo istotną rolę proliny i hydroksyproliny w regulacji TGF- β_1 , ważnego czynnika odpowiedzialnego za wzrost, proliferację i różnicowanie komórek. Wykazałem, że aminokwasy te indukują wzrost ekspresji TGF- β_1 , receptora tego czynnika wzrostowego oraz fosforylowanego czynnika transkrypcyjnego mTOR, uczestniczącego w przekazywaniu sygnału przez receptor TGF- β_1 (4). Zjawisko udziału proliny i hydroksyproliny w regulacji TGF- β_1 i mTOR potwierdzają badania opisane w odniesieniu do regulacji aktywności transkrypcyjnej HIF-1 α (2).

TGF- β_1 oprócz regulacyjnej roli w procesie wzrostu i proliferacji wielu typów komórek stymuluje także biosyntezę kolagenu, co może prowadzić do zwłóknienia tkanek. Modulacja aktywności prolidazy katalizującej hydrolizę imidodipeptydów do wolnej proliny i hydroksyproliny może zatem stanowić ważny czynnik regulujący aktywność biologiczną TGF- β_1 i daje możliwości wykorzystania tej zależności w leczeniu szeregu zaburzeń metabolicznych związanych z marskością narządów, nowotworzeniem, angiogenezą czy gojeniem ran (4).

Dalsze badania nad poszukiwaniem molekularnych mechanizmów regulacji szlaków wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału zależnych od aktywności prolidazy obejmowały szereg czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych za procesy metaboliczne w komórce. Wykazałem, że rola prolidazy w procesie biosyntezy białek nie ogranicza się jedynie do odzyskiwania substratów do ich biosyntezy, ale enzym ten może również pełnić rolę modulatora w procesach przekazywania sygnałowego regulującego procesy związane z

biosyntezą niektórych białek, np. kolagenu (3). Jednym z takich czynników regulujących proces biosyntezy kolagenu jest czynnik transkrypcyjny NF- κ B. Wykazałem, że w komórkach z podwyższoną ekspresją prolidazy ekspresja NF- κ B jest wyraźnie upośledzona, natomiast zastosowanie specyficznych inhibitorów tego enzymu (np. N-benzylloksykarbonylo-1-proliny, Cbz-Pro), podwyższa ekspresję NF κ B w komórkach (3).

Ważny obszar moich zainteresowań naukowych stanowią badania nad rolą receptorów PPAR i receptorów estrogenowych w komunikacji („cross-talk”) pomiędzy tymi receptorami oraz udziałem czynników transkrypcyjnych regulowanych przez aktywność prolidazy w procesie regulacji biosyntezy kolagenu w komórkach raka sutka (estrogeno-zależnych MCF-7 i estrogeno-niezależnych MDA-MB-231) oraz raka endometrium (Ishikawa). Termin „cross-talk” określa komunikowanie się receptorów między sobą w procesie przekazywania sygnału do jądra komórkowego po to, żeby włączyć lub wyłączyć ekspresję określonych genów. Zarówno receptor estrogenowy i PPAR- γ należą do rodziny hormonalnych receptorów jądrowych o aktywności czynników transkrypcyjnych.

Podjąłem próbę wyjaśnienia molekularnych mechanizmów zaburzeń biosyntezy kolagenu w komórkach nowotworowych oraz rolę estrogenów i ligandów receptora PPAR- γ w tym procesie. Przedmiotem mojego zainteresowania była ocena metabolicznej funkcji aktywatorów receptora PPAR- γ – tiazolidynodionów oraz telmisartanu na biosyntezę kolagenu w komórkach nowotworowych. Wykazałem, że badane ligandy w obecności pobudzonego receptora estrogenowego, indukują proces hamowania biosyntezy kolagenu. Brak estrogenu powodował natomiast pobudzenie tego procesu przez badane związki. Sugeruje to zjawisko „cross-talk” pomiędzy receptorem estrogenowym i receptorem PPAR- γ (5, 6). Wysunąłem hipotezę, że „cross-talk” zachodzi pomiędzy podjednostką α receptora estrogenowego a receptorem PPAR- γ . Przedstawiłem dowody, że zjawisko to zachodzi w komórkach raka sutka estrogeno-zależnych MCF-7 oraz raka endometrium Ishikawa, natomiast nie zachodzi w komórkach MBA-MD-231. Przyczyną tego jest fakt, że komórki estrogeno-niezależne, MDA-MB-231, posiadają jedynie receptor estrogenowy β , pozbawione są natomiast receptora estrogenowego α . Efektem wyżej opisanego zjawiska „cross-talk” pomiędzy receptorem estrogenowym α a PPAR- γ jest aktywacja szlaku sygnałowego hamującego ekspresję genów kolagenu. Zachodzi on poprzez indukcję szlaku MAP kinaz p-38 oraz ekspresję czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, którego udział w hamowaniu ekspresji

genów kolagenu typu I jest udowodniony i który w swoich badaniach wielokrotnie potwierdziłem.

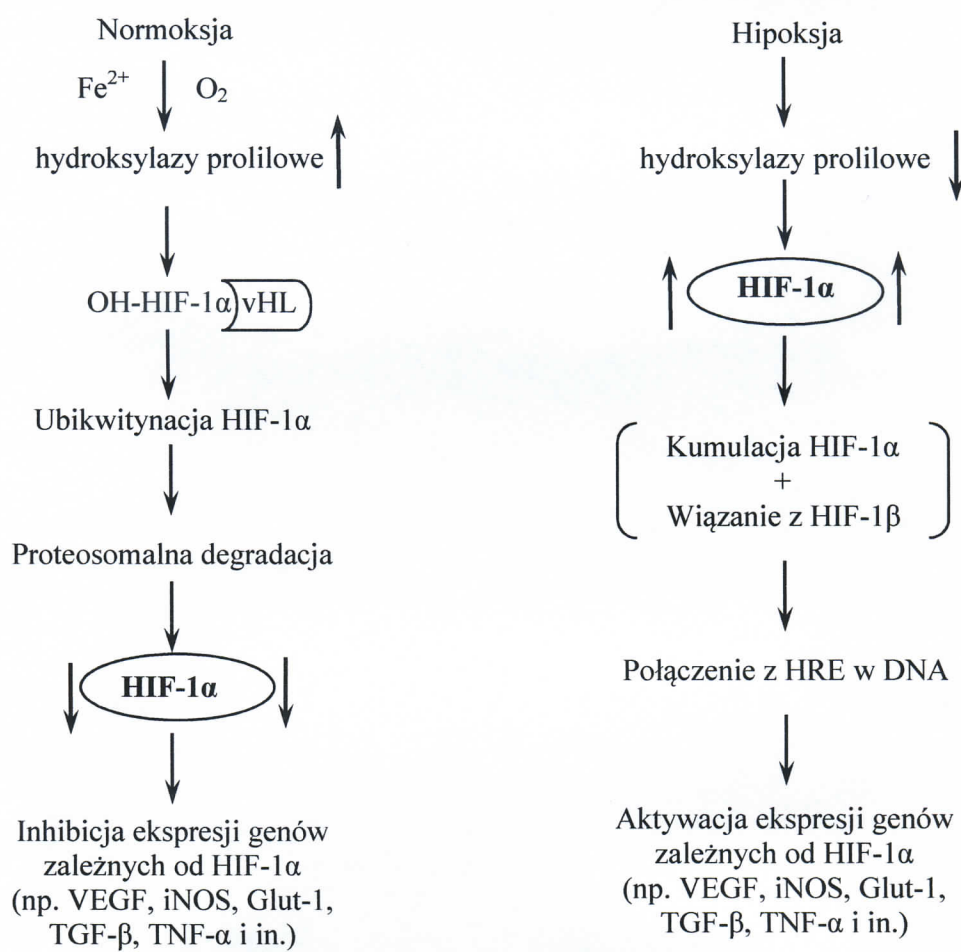
Przedstawione badania sugerują, że nie tylko receptor estrogenowy, ale również receptor PPAR- γ może stanowić molekularny cel farmakoterapii estrogenozależnych nowotworów sutka bądź endometrium.

Rola estrogenów w progresji raka piersi oraz ich udział w stymulacji aktywności prolidazy skierowały mnie do zbadania wpływu estrogenów na ekspresję czynnika HIF-1 α w komórkach estrogeno-zależnych raka piersi MCF-7 i estrogeno-niezależnych MDA-MB 231. W toku przeprowadzonych doświadczeń wykazałem, że w komórkach MCF-7 hodowanych w pożywce pozbawionej liganda receptora estrogenowego (estrogen, czerwień fenolowa) ekspresja czynnika HIF-1 α była znacznie mniejsza w porównaniu do komórek hodowanych w obecności estrogenu lub czerwieni fenolowej. Tego efektu nie zaobserwowałem w komórkach estrogeno-niezależnych MDA-MB 231 (posiadających tylko receptor estrogenowy β) co sugeruje znaczący udział receptora estrogenowego α w proces regulacji ekspresji czynnika HIF-1 α (7). Dodanie do komórek MDA-MB 231 (z wysoką aktywnością prolidazy) substratu tego enzymu, Gly-Pro lub Gly-HyPro, spowodowało wzrost ekspresji czynnika HIF-1 α w sposób zależny od użytego stężenia dipeptydów, niezależnie od obecności liganda receptora estrogenowego. Natomiast w komórkach MCF-7 (z niską aktywnością prolidazy) efekt wywołany dodaniem imidodipeptydów był mniej zaznaczony oraz wyraźnie zależny od aktywności receptora estrogenowego. W hodowlach pozbawionych liganda receptora estrogenowego dodanie wzrastających stężeń substratu dla prolidazy nie spowodowało znaczącego wzrostu ekspresji czynnika HIF-1 α (7). Wskazuje to na ważny udział receptora estrogenowego α w zależnej od prolidazy regulacji ekspresji tego ważnego czynnika transkrypcyjnego.

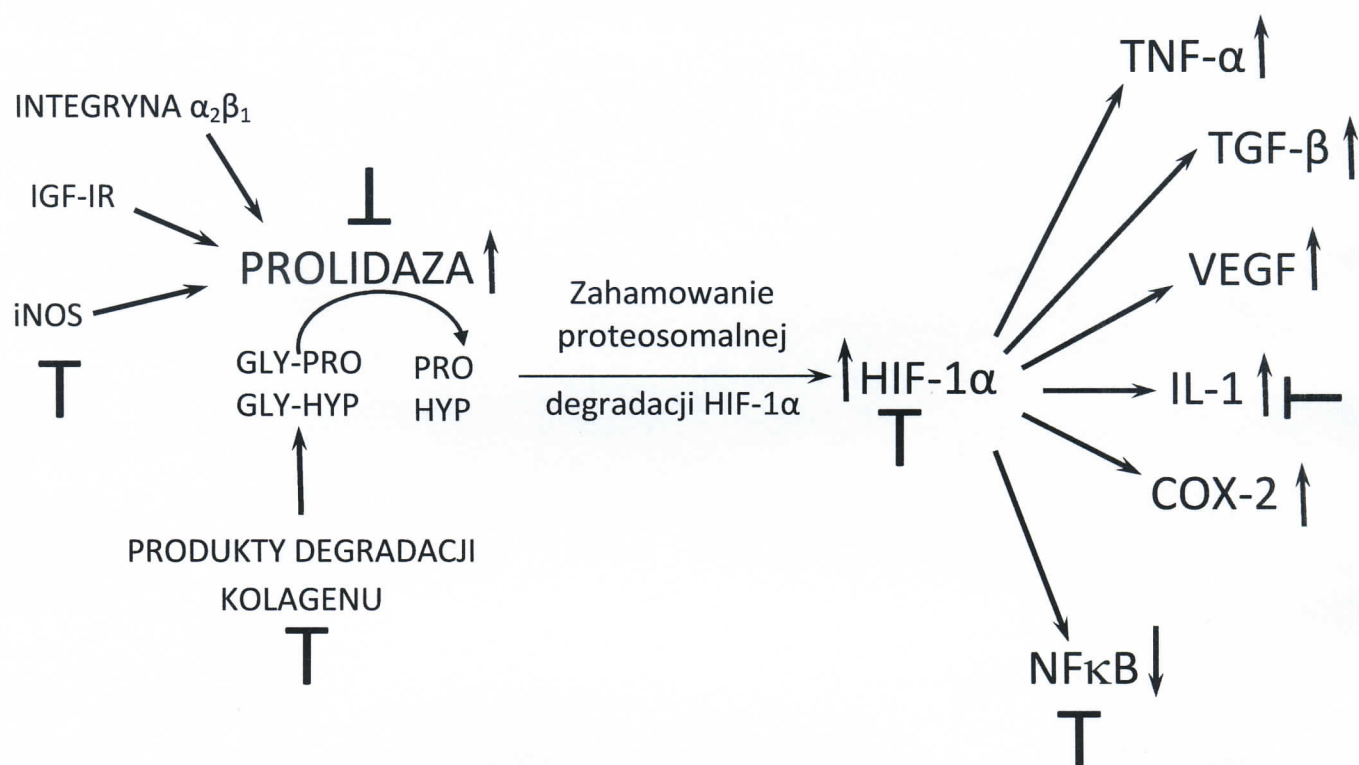
W cyklu przedstawionych prac wyjaśniłem rolę prolidazy w regulacji funkcji czynników transkrypcyjnych (HIF-1 α , NF- κ B) czynników wzrostowych (TGF- β_1) oraz udział IL-1, tlenu azotu i receptora estrogenowego α w regulacji aktywności tego enzymu.

Wyniki tych badań wskazują na nowe, punkty uchwytu eksperymentalnej farmakoterapii zapalenia i procesu nowotworowego. Mogą stanowić je między innymi inhibitory prolidazy, HIF-1 α , NF- κ B, IL-1 oraz iNOS. Ilustruje to załączony schemat 2.

Schemat 1.



Schemat 2



↑ - POBUDZENIE

T - POTENCJALNY PUNKT UCHWYTU
TERAPII INHIBITOROWEJ

IGF-IR – Receptor Insulinopodobnego czynnika wzrostowego I (insulin-like growth factor-I Receptor)

GLY-PRO – Glicylo-Prolina

GLY-HYP – Glicylo-Hydroksypolina

PRO - Prolina

HYP – Hydroksypolina

HIF-1 – Czynn timer indukowany hipoksją-1 (Hypoxia Inducible Factor 1)

IL-1 – Interleukina 1

COX – 2 - Cyklooksyzgenaza 2

iNOS - Indukowana syntaza NO (inducible Nitric Oxide Synthase)

NF- κ B- Jądrowy czynnik κ B (*Nuclear Factor kappa B*)

TNF α - Czynnik martwicy nowotworów (*Tumor Necrosing Factor α*)

TGF β – transformujący czynnik wzrostowy β (Transforming Growth Factor β)

VEGF – naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (Vascular Endothelial Growth Factor)

POZOSTAŁE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWO-BADAWCZE.

Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora.

Mój dorobek naukowy przed uzyskaniem stopnia doktora obejmuje 8 prac doświadczalnych oraz 4 doniesienia zjazdowe, prezentowane na konferencjach i zjazdach naukowych. Łączny IF prac stanowiących dorobek naukowy przed uzyskaniem stopnia doktora wynosi 12,757 i 78 punktów MNiSW.

Ważnym obszarem moich zainteresowań naukowych przed uzyskaniem stopnia doktora stanowiły badania związane z molekularnymi mechanizmami regulacji metabolizmu tkanki łącznej zwłaszcza kolagenu w patogenezie chorób, w szczególności nowotworowych oraz udziału prolidazy w tym procesie. Zaburzenia regulacji metabolizmu kolagenu prowadzą do wielu chorób, którym towarzyszy włóknienie narządów, upośledzenie gojenia się ran, deformacje szkieletowe, tętniaki i inne zmiany. Z tego powodu mechanizm regulacji biosyntezy kolagenu jest jednym z głównych kierunków badań nad biochemią tkanki łącznej.

W tkankach zmienionych chorobowo, zarówno w procesie zapalnym oraz nowotworowym, zmiany w metabolizmie kolagenu są zjawiskiem często obserwowanym, jednakże mechanizm tego procesu nie został wyjaśniony. Jedną z przypuszczalnych przyczyn tego zjawiska może być zaburzenie w regulacji aktywności metaloproteinaz, w tym prolidazy. Enzym ten jest cytoplazmatyczną egzoptydazą, katalizującą hydrolizę imidodipeptydów, w których aminokwasem C-końcowym jest prolina lub hydroksypolina. Przyjmuje się, że biologiczną rolę prolidazy jest odzyskiwanie proliny z imidodipeptydów do resyntezy kolagenu. Badania przeprowadzone nad płaskonabłonkowym nowotworem płuca wykazały znacząco wyższą zawartość kolagenu w tkance zmienionej chorobowo, któremu towarzyszyła podwyższona aktywność i ekspresja prolidazy (1). Z przeprowadzonych badań wynika, że zmiany aktywności prolidazy odzwierciedlają zaburzenia metabolizmu kolagenu, co może stanowić nieswoisty marker procesu nowotworowego w raku płuca jak również potencjalny punkt uchwytu terapii przeciwnowotworowej tej tkanki.

Zaburzenia metabolizmu kolagenu obserwowano również w zmienionej zapalnie tkance trzustki. W tym przypadku znacznemu wzrostowi zawartości kolagenu w tkance towarzyszył wzrost aktywności specyficznych metaloproteinaz – kolagenaz oraz ekspresji

podjednostki β_1 receptora integrynowego oraz nieznaczne upośledzenie aktywności prolidazy (7). Jakkolwiek w tkance trzustki zmienionej nowotworowo również zaobserwowałem podwyższoną aktywność kolagenolityczną, to jednak wykazałem w tej tkance drastyczne upośledzenie aktywności i ekspresji prolidazy (7). Zjawisko zmian aktywności prolidazy w tkance trzustki zmienionej zapalnie i nowotworowej może być dodatkowym czynnikiem różnicującym te dwa procesy.

Dalsze badania nad mechanizmem zaburzeń metabolizmu kolagenu w chorobach trzustki wykazały, że za to zjawisko mogą być odpowiedzialne czynniki pobudzające biosyntezę kolagenu. Jednym z najlepiej poznanych induktorów biosyntezy kolagenu jest insulino-podobny czynnik wzrostowy-I (IGF-I). Wykazano, że w surowicy pacjentów z rakiem trzustki poziom czynnika IGF-I oraz jego białek wiążących, IGF-BP1 i IGF-BP3, jest znacznie wyższy niż w surowicy pacjentów z trzustką zmienioną zapalnie lub u pacjentów zdrowych. Odkrycie to również może być przydatne w diagnostyce zapalenia i raka trzustki (8).

Kolejne badania dotyczyły patogenezy zaburzeń regulacji metabolizmu kolagenu u pacjentów z wrodzoną łamliwością kości – osteogenesis imperfecta (OI). Badania te wykazały, iż w fibroblastach pochodzących od pacjentów z OI dochodzi do upośledzenia biosyntezy kolagenu. Wykazano ponadto, że nowo syntetyzowany kolagen posiada nieprawidłową budowę. Zjawisku temu towarzyszy znaczne upośledzenie aktywności prolidazy, które odzwierciedla zmiany w biosyntezie tego białka (2). Zaburzenia aktywności prolidazy u pacjentów z OI wyjaśniają potencjalny mechanizm zmian zachodzących w biosyntezie kolagenu stanowiący potencjalny punkt uchwytu terapii tej choroby.

Wiele uwagi poświęciłem ocenie wpływu leków przeciwnowotworowych na metabolizm kolagenu. Zastosowanie raloksyfenu - selektywnego modulatora receptora estrogenowego czy daunorubicyny - przeciwnowotworowej antracykliny, upośledzają biosyntezę kolagenu a zmianom tym towarzyszą zmiany aktywności prolidazy (3, 5). Wysunąłem przypuszczenie, że punktem uchwytu inhibitorowego działania tych leków na biosyntezę kolagenu może być prolidaza. Stało się to inspiracją do podjęcia badań nad mechanizmem działania i funkcją prolidazy jako enzymu uczestniczącego w szlaku przekazywania sygnału w komórce. Wykazałem, że aktywność prolidazy zachodzi na etapie post-translacyjnej modyfikacji tego enzymu (4, 6).

Badania wykonywane w latach 2000 – 2002 finansowane były w ramach działalności statutowej Uczelni, w tym projekty badawcze, których byłem głównym wykonawcą.

W latach 2000-2002 byłem wyróżniony zespołową nagrodą naukową Ministra Zdrowia (2001) oraz nagrodami JM Rektora Akademii Medycznej w Białymstoku (2000, 2003).

Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora.

Mój dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora obejmuje 84 prace, w tym 38 prace doświadczalne, 1 skrypt a także 45 doniesień zjazdowych, prezentowanych na konferencjach i zjazdach naukowych krajowych i międzynarodowych. Opublikowane prace zawierają wyniki badań nad molekularnymi mechanizmami zaburzeń metabolicznych w patologicznych liniach komórkowych oraz identyfikacją punktów uchwytu nowych strategii farmakologicznych. Łączny IF prac stanowiących dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora wynosi 84,52 i 671 punktów MNiSW.

Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora stanowiła kontynuację zainteresowań mechanizmami regulacji aktywności prolidazy. Przedmiotem głównego nurtu badawczego w tym okresie było przedstawienie argumentów bezpośredniego udziału prolidazy w procesie biosyntezy kolagenu oraz podjęcie badań nad mechanizmem działania i funkcją prolidazy jako enzymu uczestniczącego w szlaku przekazywania sygnału w komórce.

Kontynuacją cyklu badań nad zaburzeniami metabolizmu kolagenu u pacjentów z OI, było wykazanie kolejnych zmian genetycznych obecnych u pacjentów dotkniętych tą chorobą. Wykazano obecność mutacji genów kolagenu, szczególnie prokolagenu typu I (*COL1A1* lub *COL1A2*) związanych z zamianą Gly 511 na Ser. Jakkolwiek w fibroblastach pacjentów OI z tą mutacją zaobserwowano zwiększoną biosyntezę kolagenu to jednak procesowi temu towarzyszył nasilony proces degradacji tego białka (10). Ważną rolę w tym procesie odgrywa prolidaza. Aktywność tego enzymu odzwierciedla zatem zmiany zachodzące w metabolizmie kolagenu fibroblastów w przebiegu omawianej choroby (17).

Badania nad mechanizmami regulacji prolidazy i rolą tego zjawiska w biosyntezie kolagenu dowiodły, że wpływ modulatorów receptora estrogenowego (9), niesteroidowych leków przeciwzapalnych (11) czy modulatorów receptora integrynowego (12) na biosyntezę kolagenu w fibroblastach skóry ludzkiej jest zależny od wpływu tych substancji na aktywność prolidazy. Zaburzenie biosyntezy kolagenu i aktywności prolidazy w wyniku działania tych substancji związane jest z zaburzeniem szlaków sygnałowych w komórce.

W celu pogłębienia wiedzy w zakresie regulacji przekazywania sygnału w komórce i udziału prolidazy w tym zakresie, odbyłem staż naukowy w Laboratory of Comparative Carcinogenesis w Narodowym Instytucie Raka, Frederick, USA (2003-2005) pod kierunkiem

dr James Phang'a - uznanego autorytetu w dziedzinie metabolizmu aminokwasów, zwłaszcza proliny i hydroksyproliny.

Biologiczna rola prolidazy polega na odzyskiwaniu L-proliny z produktów degradacji kolagenu (głównie imidodipeptydów) do procesu resyntezy kolagenu i innych białek zawierających prolinę. Mechanizm ten zapewnia równowagę procesów degradacji i biosyntezy kolagenu w tkankach. Mechanizmy wewnątrzkomórkowej regulacji aktywności prolidazy nie były dotąd poznane. W toku badań wykazałem, że prolidaza ulega fosforylacji pod wpływem sygnału generowanego przez receptory (m.in.: integrynowe i IGFR), ale również pod wpływem mediatorów zapalenia np. tlenku azotu (16). Proces fosforylacji prolidazy warunkuje nie tylko aktywność tego enzymu, ale również pozwala włączyć ten enzym do szeregu białek uczestniczących w procesie przekazywania sygnałowego. Wykazałem, że rola prolidazy w procesie biosyntezy białek nie ogranicza się jedynie do odzyskiwania substratów do ich biosyntezy, ale enzym ten może również pełnić rolę modulatora w procesach przekazywania sygnałowego regulującego procesy związane z biosyntezą białek.

Wysunąłem przypuszczenie, że prolidaza odgrywa ważną rolę w procesie zapalenia (upośledzenie aktywności prolidazy skutkuje zaburzeniem gojenia ran), a tlenek azotu (czynnik bezpośrednio związany z procesem angiogenezy), powoduje wzrost aktywności prolidazy poprzez zwiększenie jej fosforylacji (16). Skierowało to badania w kierunku powiązania prolidazy z procesem angiogenezy. W tym celu po raz pierwszy skonstruowałem plazmid dla prolidazy i otrzymałem komórki z podwyższoną ekspresją tego enzymu. Zaowocowało to zgłoszeniem patentowym Federal Register /Vol. 73, No. 57/ March 24, 2008 na wynalazek: Prolidase Expression Construct Useful as Anti-Angiogenesis Screen. W komórkach z podwyższoną ekspresją prolidazy zauważyłem znaczny wzrost ekspresji podstawowych czynników stymulujących angiogenezę: VEGF i Glut – 1. Dalsze badania wykazały, że prolidaza uczestniczy w modulacji ekspresji ważnego czynnika transkrypcyjnego jakim jest HIF-1. Upośledzenie aktywności prolidazy skutkuje defektem w przekazywaniu sygnału uczestniczącego w procesie angiogenezy, co może tłumaczyć kliniczne objawy obserwowane u pacjentów z genetycznym niedoborem prolidazy (23).

Ponadto prowadziłem badania nad udziałem prolidazy w mechanizmie karcynogenazy. Wykazałem, że zahamowanie aktywności prolidazy przez nikiel

(kompetycyjny inhibitor manganu (II), stanowiącego kofaktor prolidazy), w hodowli komórek CHO, powodowało jednocześnie zahamowanie wzrostu badanych komórek (13). Doświadczenie to sugeruje ważną rolę prolidazy w regulacji wzrostu, różnicowania i metabolizmu komórkowego.

Równolegle, prowadziłem badania nad oksydazą prolinową (POX) - enzymem, którego funkcja polega na przekształceniu proliny do kwasu pirolino-5-karboksylowego (P5C). Oksydaza prolinowa zlokalizowana jest wewnątrz błony mitochondrialnej i zaangażowana jest w proces powstawania reaktywnych form tlenu (ROS). Podwyższona zawartość tego enzymu powoduje indukcję apoptozy w komórkach nowotworowych, a mechanizm tego procesu związany jest między innymi z aktywacją genów proapoptycznych stymulowanych przez białko p53. Jednakże lokalizacja enzymu i jego udział w procesie powstawania wolnych rodników przyczynia się do indukcji apoptozy w komórce również w sposób niezależny od indukcji białka p53. Postanowiono sprawdzić czy cytoplazmatyczne i mitochondrialne dysmutazy ponadtlenkowe lub katalazy (CuZnSOD, MnSOD lub CAT) mogą wpływać na indukcję apoptozy przez POX. Metodą transfekcji uzyskano komórki DLD-1 z podwyższoną ekspresją POX (zależne od obecności tetracykliny w pożywce (tet-off)). W tak przygotowanych komórkach, zwiększono przy pomocy rekombinowanych adenowirusów zawartość enzymów antyoksydacyjnych CuZnSOD, MnSOD lub CAT. Wykazano, że jedynie podwyższenie ekspresji MnSOD powoduje znaczące zahamowanie apoptozy indukowanej przez POX. Pozostałe enzymy nie wpływają na ten proces. Sugeruje to, że nadtlenek wodoru generowany przez MnSOD powoduje zahamowanie procesu apoptozy stymulowanej przez POX (15).

W kolejnych doświadczeniach wykazaliśmy, że w komórkach DLD-1 transfekowanych POX (przy pomocy adenowirusa) nasilenie procesu apoptozy jest stymulowane nie tylko poprzez szlak mitochondrialny (szlak wewnętrzny) ale również poprzez stymulację czynników zależnych od czynnika nekrozy nowotworów (TNF- α) między innymi TRAIL, DR5 oraz aktywnej formy kaspazy-8 (szlak zewnętrzny). W proces ten zaangażowany jest szlak przekaznictwa sygnału związany z kinazami MAPK. Aktywacja POX powoduje upośledzenie fosforylacji tych kinaz. Co więcej stała aktywacja szlaku MAPK (transfekcja komórek aktywną formą kinazy MEK) znacząco hamuje wpływ POX na proces apoptozy (20).

Wykorzystując model komórkowy z POX tet-ON/OFF wykazaliśmy, iż enzym ten reguluje szlaki przekazywania sygnałowego w komórkach raka okrężnicy. Podwyższona zawartość POX znacząco redukowała aktywność i zawartość cyklooksygenazy 2, a tym samym zawartość prostaglandyny PGE2. Dodanie prostaglandyny PGE2 do hodowli komórkowych powoduje zahamowanie proapoptycznego wpływu POX na komórki. Wskazuje to na znaczący udział tego szlaku sygnałowego i samej prostaglandyny PGE2 na proces apoptozy indukowanej przez POX. Ponadto wykazaliśmy interakcje między COX-2, szlakiem Wnt/Beta-catenin i EGFR. Wzrost ekspresji POX w znaczący sposób powodował upośledzenie fosforylacji (aktywacji) EGFR. Natomiast dodatek EGF do komórek częściowo odwracał upośledzający wpływ POX na ekspresję COX-2 (27). Sugeruje to, że oksydaza prolinowa modulując potencjał oksydoredukcyjny komórki odgrywa ważną rolę w regulacji pro-nowotworowych szlaków sygnałowych.

Przeprowadzone badania dowodzą, że POX może być potencjalnym celem terapii celowanej w chorobach nowotworowych.

Po powrocie do Polski kontynuowałem badania nad udziałem prolidazy w wewnątrzkomórkowych szlakach przekazywania sygnałowego zaangażowanych w proces zapalenia i proces nowotworowy. Wykazałem, że zahamowanie aktywności prolidazy w komórkach poddanych działaniu niklu (II) (25), antybiotyku aminoglikozydowego - netelmycyny (19) antybiotyku przeciwnowotworowego – puromycyny (14) bądź też różnych modulatorów receptorów estrogenowych (Raloxifen, Tamoxifen) (30) prowadzi do upośledzenia metabolizmu kolagenu i w efekcie zaburza interakcję między komórkami a macierzą pozakomórkową, przyczyniając się do zakłócenia szlaków sygnałowych regulujących metabolizm, ekspresję genów, stabilność genomu, różnicowanie i proliferację komórek. Badania dowiodły, że upośledzenie biosyntezy kolagenu związane z zahamowaniem aktywności prolidazy nie było związane z obniżeniem ekspresji genów kolagenu, gdyż nie zaobserwowałem obniżenia ekspresji mRNA tego białka w badanych komórkach. Sugerowało to regulację tego procesu na etapie post-transkrypcyjnym. Zaobserwowano natomiast obniżenie ekspresji białek związanych ze szlakiem sygnałowym MAP-kinaz (25). Wyniki tych badań pozwalają włączyć prolidazę w mechanizm regulacji metabolizmu białek i sugeruje wykorzystanie prolidazy jako potencjalnego punktu uchwytu terapii schorzeń przebiegających z zaburzeniami metabolizmu kolagenu.

Wysunąłem przypuszczenie, że prolidaza odgrywa ważną rolę w procesie zapalenia (upośledzenie aktywności prolidazy skutkuje zaburzeniem gojenia ran), a tlenek azotu (czynnik bezpośrednio związany z procesem zapalnym i angiogenezą), powoduje wzrost aktywności prolidazy poprzez zwiększenie jej fosforylacji. Skierowało to moje zainteresowanie na udział metaloproteinaz (w tym prolidazy) w procesie zapalenia.

Wykazałem, że w eksperymentalnym modelu procesu zapalnego indukowanym przez IL-1, dochodzi do pobudzenia degradacji kolagenu przez metaloproteinazy, a czynnikiem odpowiedzialnym za indukcję tego procesu jest tlenek azotu (31). Inkubacja ludzkich chondrocytów z IL-1 spowodowała aktywację czynnika NF- κ B oraz indukcję ekspresji syntazy tlenku azotu (iNOS). Zwieńczeniem badań nad patobiochemią i farmakoterapią procesów zapalnych było wyjaśnienie mechanizmu protekcyjnego działania kwasu hialuronowego na zaburzenia metabolizmu kolagenu obserwowane w przebiegu doświadczalnego zapalenia w hodowli chondrocytów. Zastosowanie kwasu hialuronowego hamowało aktywację NF- κ B i ekspresję iNOS, a w efekcie przeciwdziało indukowanej przez IL-1 aktywacji metaloproteinaz i degradacji kolagenu. Wskazuje to na ważną rolę tlenku azotu w mechanizmie protekcyjnego działania HA na proces degradacji kolagenu w przebiegu doświadczalnego zapalenia w hodowli chondrocytów ludzkich. Wiedza w tym zakresie może przyczynić się do doskonalenia farmakoterapii zapalenia stawów poprzez zastosowanie inhibitorów NF- κ B lub iNOS (18, 31).

Ponadto HA w zastosowanym modelu zapalenia powoduje odwrócenie inhibicyjnego wpływu IL-1 na receptor IGF-IR oraz związany z tym receptorem szlak MAPK oraz AKT (28). Uzyskane wyniki wskazują na ochronną rolę HA w procesie zaburzenia metabolizmu kolagenu wywołanym IL-1 w hodowli ludzkich chondrocytów i fibroblastów.

Dalsze badania nad poszukiwaniem nowych strategii hamowania zaburzeń metabolizmu kolagenu indukowanych przez interleukinę 1 oraz opublikowane badania dotyczące udziału obwodowych receptorów benzodiazepinowych (PBR) w rozwoju nowotworu, nasunęły przypuszczenie o możliwości zastosowania ligandów PBR jako czynników przeciwdziałających rozwojowi stanu zapalnego oraz degradacji tkanki chrzęstnej. Zastosowanie Ro-54864 agonisty receptora PBR przeciwdziało hamowaniu biosyntezy kolagenu oraz DNA w komórkach poddanych działaniu IL-1. Mechanizm protekcyjnego działania Ro-54864 na te procesy obejmował indukcję ekspresji receptora insulinopodobnego czynnika wzrostowego – I oraz białek aktywowanych przez ten receptor -

AKT i białka mTOR. Nie wpływał natomiast na szlak sygnałowy zależny od kinaz Ras-Raf-MAPK (34). Badania te sugerują, że zastosowanie agonistów obwodowych receptorów benzodiazepinowych może stanowić nowy kierunek w terapii procesów zapalnych.

Kolejnym aspektem prowadzonych przeze mnie badań było poszukiwanie sposobów zwiększenia skuteczności eksperymentalnej terapii lekami przeciwnowotworowymi z grupy środków alkilujących. Badaniom poddane zostały nowe berenilowe pochodne cisplatyny, które wykazywały większą efektywność przeciwnowotworową niż sama cisplatyna. Ich mechanizm działania, oprócz oddziaływania ze specyficznymi obszarami DNA, rozszerza się na zaburzenia przekazywania sygnałowego w komórce nowotworowej związanej z kinazami MAPK (32, 35, 38). Poszukiwanie nowych strategii przeciwnowotworowych obejmowały również badania nad skojarzonym działaniem dezintegryny (echistatyny) z melfalanem, powszechnie stosowanym lekiem przeciwnowotworowym. Równoczesne zastosowanie obu substancji przyczynia się do zwiększenia ich aktywności antyproliferacyjnej. Pozwala to na zmniejszenie terapeutycznej dawki melfalanu i zmniejszenie niepożądanych efektów jego działania (29). Badania te zapoczątkowują kolejny obszar moich zainteresowań nad strategią skojarzonego zastosowania inhibitorów szlaków sygnałowych z cytostatykami w eksperymentalnej terapii raka.

Arkadiusz Surayński