

Waldemar Wagner
Instytut Biologii Medycznej PAN

AUTOREFERAT
do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego

Łódź 2018

Spis treści:

Życiorys.....	2
Omówienie wskazanego osiągnięcia naukowego.....	3
Pozostałe osiągnięcia naukowo – badawcze.....	16
• Udział w projektach badawczych.....	20
• Udział w konferencjach naukowych.....	22
• Otrzymane nagrody i wyróżnienia.....	23
• Staże w zagranicznych lub krajowych ośrodkach naukowych lub akademickich.....	23
• Praca recenzencka.....	23
• Członkostwo w towarzystwach naukowych.....	23
• Osiągnięcia dydaktyczne i w zakresie popularyzacji nauki.....	24

1. Imię i Nazwisko.

Waldemar Wagner

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

2003 Akademia Medyczna w Łodzi

Wydział Lekarski

tytuł naukowy: doktor nauk medycznych, specjalizacja: biologia medyczna
Układ histaminowy w gruczole mlekowym myszy. Odpowiedź na blokowanie ekspresji genu dekarboksylazy histydynowej.

1992 – 1997 Uniwersytet Łódzki,

Wydział Biologii i Nauk o Ziemi,

studia dzienne magisterskie

kierunek: biologia, specjalizacja: mikrobiologia

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

• Instytut Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi

93-232 Łódź, ul. Lodowa 106, Pracownia Immunologii Komórkowej

01.04.2014 - do chwili obecnej - asystent naukowo-badawczy

01.04.2008 – 31.03.2014 - adiunkt

• Centrum Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi

93-232 Łódź, ul. Lodowa 106, Pracownia Immunologii Komórkowej

02.11.2004 - 31.03.2008 - adiunkt

01.01.2004 - 01.11.2004 - asystent naukowo-badawczy

• Zakład Amin Biogennych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi

90-364 Łódź, ul. Tylna 3, Pracownia Metabolizmu

06.10.1997 - 31.12.2003 - asystent naukowo-badawczy

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego,

Receptorowe i niereceptorowe oddziaływanie kwasu L- i D-mlekowego na komórki nowotworowe raka szyjki macicy oraz komórki związane z mikrośrodowiskiem guza. Cykl 5 publikacji.

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa),

1. Ciszewski WM, **Wagner W**, Kania KD, Dastych J. *Interleukin-4 enhances PARP-dependent DNA repair activity in vitro.*

J Interferon Cytokine Res. 2014 Sep;34(9):734-40. Wojciech Ciszewski i Waldemar Wagner zadeklarowali równy udział w powstaniu publikacji (właściwa adnotacja została zamieszczona w publikacji). *Impact factor – 2,000; 25 pkt*

Wkład habilitanta: 40 % - habilitant zaplanował i nadzorował dużą część eksperymentów, w tym pomiar naprawy DNA w oparciu o detekcję γ -H2AX, pomiar poli(ADP)-rybozylacji białek (Western blot) oraz pomiar apoptozy. Habilitant opracował wyniki własnych eksperymentów i brał udział w przygotowaniu wstępnej wersji manuskryptu.

2. **Wagner W**, Ciszewski W, Kania K, Dastyh J. *Lactate Stimulates IL-4 and IL-13 Production in Activated HuT-78 T Lymphocytes Through a Process That Involves Monocarboxylate Transporters and Protein Hyperacetylation.*

J Interferon Cytokine Res. 2016 May;36(5):317-27. *Impact factor – 2,377; 20 pkt*

Wkład habilitanta: 70 % - habilitant przygotował projekt badań, zaplanował, nadzorował lub przeprowadził dużą część eksperymentów, za wyjątkiem wykonania eksperymentów pomiaru IL-13 w obecności inhibitorów CHCA, NaB i SAHA oraz DHBA, pomiaru kinetyki acetylacji histonów w komórkach oraz pomiaru aktywności transkrypcyjnej genów i konstruktów reporterowych. Habilitant opracował wyniki i przygotował wstępną wersję manuskryptu.

3. **Wagner W**, Ciszewski WM, Kania KD. *L- and D-lactate enhance DNA repair and modulate the resistance of cervical carcinoma cells to anticancer drugs via histone deacetylase inhibition and hydroxycarboxylic acid receptor 1 activation.*

Cell Commun Signal. 2015 Jul 25;13:36. Wojciech Ciszewski i Waldemar Wagner zadeklarowali równy udział w powstaniu publikacji (właściwa adnotacja została zamieszczona w publikacji).

Impact factor – 3,661; 30 pkt

Wkład habilitanta: 45 % - habilitant przygotował projekt badań, zaplanował i nadzorował dużą część eksperymentów, w tym pomiaru acetylacji histonów H3 i H4 oraz pomiar kondensacji chromatyny, pomiar naprawy DNA w oparciu o detekcję γ -H2AX, pomiaru aktywności białka DNA-PKcs, lokalizację receptora HCAR1 w komórkach (immunocytochemia, Western blot), pomiaru przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego (cAMP, MAPK). Habilitant opracował wyniki i napisał w 80% manuskrypt, przygotował go do publikacji oraz przeprowadził cały proces publikacyjny pracy (**autor korespondujący**).

4. **Wagner W**, Kania KD, Ciszewski WM. *Stimulation of lactate receptor (HCAR1) affects cellular DNA repair capacity.*

DNA Repair (Amst). 2017 Apr;52:49-58. *Impact factor – 3,61; 35 pkt*

Wkład habilitanta: 90 % - habilitant przygotował projekt badań, zaplanował, nadzorował lub przeprowadził wszystkie eksperymenty, za wyjątkiem wykonania pomiaru uszkodzeń DNA w komórkach metodą kometową oraz pomiaru ekspresji genów metodą Real-time PCR. Habilitant opracował wyniki, napisał i przygotował manuskrypt oraz przeprowadził cały proces publikacyjny pracy (**autor korespondujący**).

5. **Wagner W**, Kania KD, Blauz A, Ciszewski WM. *The lactate receptor (HCAR1/GPR81) contributes to doxorubicin chemoresistance via ABCB1 transporter up-regulation in human cervical cancer HeLa cells.*

J Physiol Pharmacol. 2017 Aug;68(4):555-564. *Impact factor – 2,883; 25 pkt*

Wkład habilitanta: 85 % - habilitant przygotował projekt badań, nadzorował lub przeprowadził wszystkie eksperymenty, za wyjątkiem wykonania pomiaru cytotoxyczości, pomiaru transportu komórkowego metodą cytometrii przepływowej oraz pomiaru ekspresji genów metodą Real-time PCR. Habilitant opracował wyniki, napisał i przygotował manuskrypt oraz przeprowadził cały proces publikacyjny pracy (**autor korespondujący**).

Analiza bibliometryczna publikacji przedstawionych do oceny:

- Sumaryczny impact factor 5 publikacji zgodnie z rokiem opublikowania: **14,531**
- Sumaryczna punktacja 5 publikacji według kryteriów Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego: **135**

c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Najnowsze doniesienia literatury naukowej ukazują mleczan jako aktywny metabolit, pseudo-hormon koordynujący procesy metaboliczne na poziomie komórkowym i systemowym. Rolę kwasu mlekowego jako cząsteczka sygnałowa potwierdziło wiele obserwacji wskazując, iż działanie mleczanu wywołuje efekty charakterystyczne dla efektów niedotlenienia, stymuluje procesy rozrostu tkanki łącznej, zwiększa migrację komórek śródbłonna oraz angiogenezę guza nowotworowego. Miejscowo produkowany kwas L-mlekowy może oddziaływać tak jak hormon w sposób autokryny i/lub parakryny poprzez specyficzny powierzchniowy receptor dla kwasów hydroksykarboksylowych 1 - HCAR1 (hydroxycarboxylic acid receptor 1; opisywany również jako HCA1 lub GPR81). Pierwsze obserwacje dotyczące funkcji tego receptora pokazały jego hamujące działanie na proces lipolizy i uwalnianie kwasów tłuszczowych z tkanki tłuszczowej oraz modulowanie aktywności neuronów korowych. W ciągu ostatnich lat pojawiło się wiele publikacji naukowych opisujących zaangażowanie HCAR1 w różne procesy fizjologiczne i patologiczne takie jak regulacja ekspresji transporterów kwasów monokarboksylowych (monocarboxylate transporters; MCTs), pozytywny wpływ na wzrost i przerzutowanie komórek raka trzustki, rozwój i przeżywalność komórek raka piersi HER2⁺ oraz TNBC (triple negative breast cancer) oraz stymulacja angiogenezy w guzach raka piersi. Ponadto wykazano, iż obecność HCAR1 wpływa na interakcje pomiędzy komórkami nowotworowymi a układem immunologicznym, gdyż autokryna/parakryna stymulacja HCAR1 w komórkach raka płuca wywołuje zwiększenie ekspresji ligandu PD-L1 dla immunoreceptora PD-1 (Receptor programowanej śmierci) na limfocytach T i B.

Wewnątrzkomórkowa aktywność kwasu mlekowego zależy od aktywności transporterów kwasów

monokarboksylowych, które to warunkują transport mleczanów do i na zewnątrz komórki. Badania funkcjonalne transporterów MCT1-4 wykazały ich obecność w błonie komórkowej różnych typów komórek (także komórek raka) oraz wykazały, iż dwukierunkowy transport kwasów monokarboksylowych (np. kwas mlekowy, kwas pirogronowy, kwas octowy) przez błonę komórkową jest zależny od gradientu stężeń substratu i jonów wodorowych. Komórki charakteryzujące się wysokim tempem metabolizmu glukozy, jak większość komórek nowotworowych, transportują kwas mlekowy na zewnątrz komórki aby zachować wewnątrzkomórkową homeostazę, natomiast komórki takie jak astrocyty, komórki serca, komórki mięśni szkieletowych transportują mleczań do wnętrza komórki i używają jako substrat energetyczny bądź jako substrat do glukoneogenezy (hepatocyty). Wewnątrzkomórkowa aktywność kwasu L- i D-mlekowego związana jest z hamowaniem aktywności enzymatycznej białka deacetylazy histonów. Deacetylazy histonów (HDAC) wraz z acetylazami histonów (HAT) stanowią parę białek enzymatycznych odpowiedzialnych za posttranslacyjną acetylację białek i utrzymaniu właściwego statusu tej modyfikacji na powierzchni cząsteczki białka. Szczególne znaczenie ta modyfikacja chemiczna ma dla oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy histonami a DNA. Acetylaza histonowa przenosi grupę acetylową z acetylo-CoA na grupę ϵ -aminową reszty lizyny, neutralizuje jej dodatni ładunek i zwiększa hydrofobowość, co rozluźnia strukturę chromatyny i ułatwia dostęp maszynerii transkrypcyjnej do DNA. Z kolei odwrotne działanie HDAC powoduje kondensację chromatyny i zahamowanie transkrypcji. Podsumowując dotychczasową naukową wiedzę na temat kwasu mlekowego, jego powszechne występowanie jako produkt metabolizmu komórek eukariotycznych i symbiotycznych bakterii jak i jego udział w epigenetycznej regulacji ekspresji genów oraz oddziaływanie na aktywność komórek poprzez specyficzny receptor powierzchniowy (HCAR1) można zasugerować stwierdzenie, że cząsteczka ta pełni istotną rolę w fizjologii na poziomie pojedynczych komórek jak i całego organizmu. W

ostatnich latach kwas mlekowy budzi szczególne zainteresowanie badaczy ze względu na pojawianie się coraz większej liczby obserwacji wskazujących na to, iż procesy rozwoju nowotworu, metastazy i oporności na leczenie są ściśle uwarunkowane aktywnością komórek z otoczenia guza (komórki układu immunologicznego, śródbłónka naczyń krwionośnych), aktywnością glikolityczną komórek nowotworowych guza oraz ich wzajemną interakcją.

W niniejszym omówieniu chciałbym przedstawić moje badania nad oddziaływaniem kwasu L- i D-mlekowego z komórkami immunologicznymi i nowotworowymi w aspekcie rozwoju oporności komórek nowotworowych na chemioterapię. Punktem wyjścia do ich rozpoczęcia były prace związane z badaniem oddziaływania L- i D-mleczanu na wydzielanie przez limfocyty ludzkie i mysie cytokin oraz wpływu pobudzonej w ten sposób sieci cytokinowej (IL-4) na oporność komórek nowotworowych i fibroblastów na czynniki genotoksyczne jak i leki przeciwnowotworowe (cisplatyna, bleomycyna). Wyniki tych badań zawarłem w pracach 1 i 2. W przeprowadzonych badaniach wykazałem, że pobudzone ludzkie limfocyty T (linia komórkowa HuT-78, Jurkat) pod wpływem L- bądź D-mleczanu wydzielają wielokrotnie więcej IL-4 oraz IL-13. Podobne zjawisko zaobserwowałem w mysich limfocytach T (linia komórkowa EL-4) gdzie korzystając z mysich linii reporterowych zawierających transgeny Il4-EGFP lub Ifn γ -EGFP pokazałem wpływ kwasu mlekowego na indukcję IL-4, która działa stymulująco na limfocyty Th2 oraz hamowanie ekspresji IFN- γ , który działa stymulująco na limfocyty Th1. Co ciekawe, kwas D-mlekowy okazał się najaktywniejszą cząsteczką obok badanych silnych inhibitorów deacetylaz histonów takich jak kwas masłowy czy kwas suberanilohydroksamowy/Worinostat. Acetylacja histonów w obrębie loci dla cytokin Th2 jest uważana za krytyczna dla ekspresji IL-4 oraz IL-13, a ponadto acetylacja czynnika transkrypcyjnego GATA-3 zwiększa jego potencjał do transaktywacji genów dla obu cytokin. W swoich badaniach udowodniłem, iż proces indukcji tych cytokin jest zależny od aktywności błonowych transporterów monokarboksylowych (MCT1), które transportują

kwasy mlekowe do wnętrza komórki a efektem tego zjawiska był wzrost acetylacji białek, w tym histonów H3 i H4. Wykazałem również, iż pod wpływem kwasu mlekowego dochodzi do wzrostu acetylacji czynnika transkrypcyjnego GATA-3 i wiązania się go do reporterowego konstruktu CGRE-IL13P. Aby zweryfikować hipotezę o receptorowej drodze działania kwasu mlekowego na ekspresję genetyczną IL-4 i IL-13 przeprowadziłem badania z wykorzystaniem kwasu 3,5-dihydroksybenzoesowego (DHBA), innego naturalnego ligandu dla receptora kwasu mlekowego HCAR1. Wyniki tych badań pokazały, że DHBA nie wpływa na wydzielanie IL-13, a zatem kwasy L- i D-mlekowe są zaangażowane w epigenetyczną regulację ekspresji genów dla IL-4 i IL-13 w modelowych liniach limfocytów T.

Cytokiny są regulatorami szeregu procesów komórkowych, dzięki którym aktywności pojedynczych komórek mogą zostać podporządkowane potrzebom zachowania homeostazy w całym organizmie. IL-4 jest jedną z cytokin o podstawowym znaczeniu dla regulacji odpowiedzi odpornościowej organizmu. Jednak plejotropowe działanie IL-4 nie ogranicza się do układu odpornościowego lecz oddziałuje na wszystkie komórki posiadające receptor IL4R α , w tym i nowotworowe. Ostatnie wyniki badań naukowych, własnych jak i ostatnie doniesienia literaturowe pokazują, że cytokina ta poza zdolnością pobudzania procesów komórkowych, takie jak dojrzewanie komórek wydzielniczych nabłonka i wzrost produkcji śluzu, zwiększenie syntezy kolagenu przez fibroblasty i cytochromu P 450 przez hepatocyty, mobilizuje również mechanizmy adaptacyjne, które pomagają chronić integralność informacji genetycznej organizmu. Powstawanie uszkodzeń DNA jest procesem ciągłym, dlatego też sprawne mechanizmy naprawy DNA mają ogromne znaczenie w utrzymaniu stabilności genomowego DNA. Potencjał naprawczy DNA komórki w komórkach nowotworowych jest szczególnie ważny gdyż jak wiadomo, chemioterapeutyki których działanie oparte jest na uszkodzaniu DNA komórki stanowią trzon podstawowych leków przeciwnowotworowych. W literaturze istnieje bogata lista publikacji szeroko

opisujących efekty oddziaływania IL-4 na komórki nowotworowe guza jak i komórki mikrośrodowiska guza, a co ciekawe konkluzje autorów są niejednokrotnie sprzeczne. Wstępne wyniki badań własnych dotyczących indukcji wydzielania IL-4 przez limfocyty w obecności mleczanu skłoniły mnie do zbudowania hipotezy, iż kwas mlekowy produkowany przez komórki guza nowotworowego stymuluje wydzielanie IL-4 przez otaczające guz limfocyty, a następnie interleukina ta zwrótnie może wpływać na oporność guza na leczenie. W pracy 1 potwierdziłem tezę, iż IL-4 wpływa na potencjał naprawczy DNA komórek normalnych i nowotworowych. Wykazałem, że mysie fibroblasty stymulowane IL-4 szybciej naprawiają uszkodzone DNA po narażeniu na bleomycynę, cisplatynę oraz chlorek rtęci. Jako drugi model badawczy wykorzystałem komórki nowotworowe linii glejaka, charakteryzujące się normalną ekspresją DNA-PKcs, głównego enzymu szlaku niehomologicznego łączenia końców DNA (linia M059K) lub brakiem tego enzymu (linia M059J). Wykazałem, że IL-4 stymuluje naprawę DNA także w komórkach glejaka pozbawionych ekspresji DNA-PKcs, natomiast zarówno w fibroblastach jak i komórkach glejaka wzrasta poli(ADP)-rybozylacja białek. Ostatecznie wykazałem, iż obserwowany proces stymulacji napraw DNA przez IL-4 związany jest ze wzrostem aktywności PARP-zależnego systemu naprawy DNA tzw. B-NHEJ.

W kolejnych badaniach kontynuowałem tematykę wpływu czynników endogennych na potencjał naprawczy DNA komórek nowotworowych i ich oporność na chemioterapeutyki (prace 3, 4 i 5). W tym czasie realizowałem jako kierownik projekt zatytułowany „Efekt receptorowego oddziaływania L- i D-mleczanu na komórki raka szyjki macicy. Modulacja przez mleczan naprawy uszkodzeń komórkowego DNA wywołanych chemioterapeutykami” finansowany przez Narodowe Centrum Nauki. Zadaniem tego projektu było zdobycie wiedzy na temat wpływu stymulacji receptora HCAR1 na aktywność komórek raka szyjki macicy, a w szczególności na funkcjonowanie komórek jednocześnie poddawanych stymulacji mleczanem i narażeniu na leki przeciwnowotworowe. Udział

powierzchniowych receptorów komórkowych w regulacji aktywności mechanizmów naprawy DNA jest powszechnie uznawany. Jednym z najważniejszych receptorów tego typu jest receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu – EGFR, którego nadekspresja często towarzyszy nowotworom. Aktywacja tego receptora przez ligand aktywuje kaskadę sygnału wewnątrzkomórkowego (Ras/Raf/MEK/ERK i AKT) zależną od kinaz MAP i PI3, czego efektem jest m.in. przestrojenie głównych komórkowych systemów napraw DNA: systemu niehomologicznego łączenia końców DNA i systemu homologicznej rekombinacji, a w efekcie zwiększona odporność na czynniki uszkadzające DNA. Podobne zjawisko zaobserwowano dla receptorów IGFR1 (receptor dla insulinopodobnego czynnika wzrostu) i c-Met (receptor dla czynnika wzrostu dla hepatocytów). Mianowicie, aktywacja IGFR1 jak i c-Met zmienia sposób oddziaływania białka RAD51 z uszkodzoną nicią DNA i w ten sposób wpływa na oporności komórek na promieniowanie jonizujące. Kobięce narządy rodne, a dokładnie nabłonek pochwy i szyjki macicy są skolonizowane przez symbiotyczne bakterie, głównie z rodzaju *Lactobacilli* produkujące L- i D- kwas mlekowy. Symbiotyczne bakterie kwasu mlekowego ściśle adherują do komórek nabłonkowych tworząc ochronny biofilm broniący przed dostępem patogennych szczepów bakteryjnych oraz ograniczają rozwój chorobotwórczych bakterii poprzez zakwaszanie środowiska kwasem mlekowym. Śluz pochwy i szyjki macicy kobiety zawiera od 10 do 50 mmol/L kwasu mlekowego w postaci mieszaniny enancjomerów L- i D- mlecyanu i proporcji około 1 : 1. W warunkach fizjologicznych, D/L-mlecyan produkowany przez bakterie może oddziaływać na komórki pochwy i szyjki macicy poprzez swoisty receptor dla mlecyanu HCAR1. Najwyższą ekspresję tego receptora zidentyfikowano w komórkach tkanki tłuszczowej, ale jego ekspresję potwierdzono także w wielu komórkach nowotworowych: raka trzustki, raka piersi, raka płuca oraz komórek linii raka szyjki macicy. W pracy 3 wykazałem iż, mlecyan aktywują drogę przekazywania sygnału zależną od cAMP i MAP kinaz w komórkach raka szyjki macicy w sposób zależny od pobudzenia swoistego

receptora. Zjawisku temu towarzyszyły zmiany w dynamice napraw uszkodzonego komórkowego DNA oraz oporności komórek raka szyjki macicy na chemioterapeutyki stosowane w terapii przeciwnowotworowej: cisplatynę, dokсорubicynę a także neokarcynostatynę. Jednym z głównych białek odpowiedzialnych za naprawę podwójnych pęknięć DNA jest kinaza białkowa zależna od DNA - DNA-PKcs. W oparciu o badania immunocytochemiczne przy użyciu przeciwciał anti-DNAPKcs oraz anti-p-DNAPKcs wykazałem istotnie zwiększoną akumulację białka oraz jego aktywność w jądrze komórkowym po ekspozycji na neokarcynostatynę w komórkach stymulowanych mleczanem. Komórki stymulowane przez 24 godziny 20 mM L- lub D-mleczanem a następnie eksponowane na działanie chemioterapeutyku znacząco szybciej naprawiały podwójne pęknięcia DNA niż komórki kontrolne mierzone zarówno badaniem poziomu fosforylacji histonu H2AX jak i metodą kometową. Komórki linii HeLa, Ca Ski i C33A stymulowane L-, D-mleczanem bądź agonistą HCAR1-3,5-DHBA wykazały znaczący wzrost przeżywalności po ekspozycji na czynniki uszkadzające DNA: dokсорubicynę, cisplatynę i neokarcynostatynę. Pokazałem również iż, zablokowanie aktywności receptora HCAR1 poprzez inkubację z toksyną krztuścową bądź wyciszenie genu dla HCAR1 w komórkach HeLa spowodowało znaczące obniżenie efektu stymulacji napraw DNA przez mleczany. Ponadto, wykazałem istotną rolę transporterów monokarboksyłowych (MCT) w procesie stymulacji napraw DNA przez mleczany. Zahamowanie aktywności transporterów monokarboksyłowych przy pomocy inhibitora α -CHCA wywołało zniesienie efektu stymulacji napraw DNA i wzrostu przeżywalności przez L- i D-mleczan po ekspozycji na neokarcynostatynę, natomiast wyciszenie genu dla HCAR1 znacząco obniżyło ekspresję genu dla transportera monokarboksyłowego 4 odpowiedzialnego za transport mleczanu do komórek. Ponieważ mechanizmy epigenetyczne mają bezpośredni wpływ na proces naprawy DNA, a L- i D-mleczan są słabymi inhibitorami deacetylaz histonów sprawdziłem czy tą cechę mleczanów mogę zaobserwować w moim modelu badawczym. Wyniki doświadczeń pokazały iż, L-

mleczan i D-mleczan hamują aktywność deacetylaz histonów I/II w komórkach HeLa. Ponadto, wykazałem, iż inkubacja komórek HeLa z mleczanem wywołuje wzrost acetylacji histonów H3 i H4 oraz indukuje relaksację chromatyny. Następstwem tych zmian była aktywacja procesów transkrypcyjnych w komórce czego efektem było zaobserwowanie znaczącego wzrostu ekspresji genów związanych z naprawą DNA: NBS1, LIG4 i APTX. W mojej opinii zrealizowany projekt badawczy umożliwił głębsze poznanie interakcji komórka ssacza – mikroorganizm jakie zachodzą w obrębie dróg rodnych kobiety, ale w całkiem nowym i nie badanym wcześniej wymiarze. Opublikowane wyniki ukazały również swoisty mechanizm oddziaływania mleczanu na komórki nabłonka szyjki macicy, manifestującego się w postaci modulacji aktywności komórkowych mechanizmów naprawy DNA jak i zmiany oporności komórek na chemioterapeutyki.

Prace 4 i 5 są tematycznym uzupełnieniem pracy 3, a ich celem było dogłębne scharakteryzowanie zależności między receptorem HCAR1 a opornością na chemoterapeutyki komórek raka szyjki macicy. W pracy 4 wykazałem, że stymulacja HCAR1 przy użyciu 3,5-DHBA istotnie wpływa na ekspresję ważnych białek zaangażowanych w naprawę uszkodzonego DNA. Są nimi BRCA1 oraz Nibrin, obydwa pełniące istotne funkcje w procesie naprawy DNA przez system homologicznej rekombinacji (HR). Pokazałem również, iż wyciszenie genu dla HCAR1 w komórkach HeLa spowodowało znaczące obniżenie poziomu BRCA1 i Nibrin w komórkach oraz wpłynęło negatywnie na dystrybucję białka DNA-PKcs w jądrze komórkowym. Ponadto udokumentowałem, iż upośledzenie funkcji HCAR1 w komórkach zwiększa ich wrażliwość na chemioterapeutyki (cisplatynę i doksorubicynę). W pracy 5 zająłem się kolejnym elementem mechanizmu lekooporności komórek nowotworowych, a mianowicie białkami oporności wielolekowej. W ostatniej pracy zaprezentowanego cyklu wykazałem, iż kwas L- i D-mlekowy oraz 3,5-DHBA zwiększają ekspresję białka oporności wielolekowej ABCB1 (MDR1/Pgp). Udowodniłem, iż komórki HeLa z wyciszonym receptorem HCAR1 wykazują znacząco niższy poziom transportera

ABCB1 w komórkach oraz w konsekwencji wolniej wytransportowują na zewnątrz komórek doksorubicynę ale także swoiste dla tego transportera fluorescencyjne substraty. W efekcie komórki ze zredukowaną ekspresją receptora wykazywały większą wrażliwość komórek na chemioterapeutyki. Ponadto udokumentowałem, iż szlak kinazy białkowej C (PKC) jest częściowo zaangażowany w regulację mechanizmów oporności na chemioterapeutyki zależne od receptora HCAR1 przedstawione w pracach 4 i 5.

Przedstawione wyniki prac sugerują, iż zaobserwowany wzrost efektywności naprawy DNA komórek w obecności mleczanu może odzwierciedlać realny problem kliniczny zwiększonej oporności raków złośliwych szyjki macicy na standardowe przeciwnowotworowe terapie kliniczne: radioterapię i chemioterapię (cisplatyną). W tej sytuacji, neutralizacja działania mleczanu na przykład poprzez zastosowanie antagonisty receptora HCAR1 na czas radio/chemoterapii raka szyjki macicy mogłoby skrócić i zwiększyć efektywność terapii przeciwnowotworowej.

Za najważniejsze osiągnięcia w mojej pracy uważam:

- Wykazanie, iż kwas L- i D-mlekowy zwiększają produkcję i wydzielanie IL-4 i IL-13 w komórkach limfocytów ludzkich. Proces ten jest ściśle zależny od wewnątrzkomórkowej obecności mleczanów oraz wiąże się ze wzrostem acetylacji białek jądrowych co sugeruje epigenetyczną regulację genów *IL-4* i *IL-13*.
- Opisanie nowej właściwości IL-4, która obejmuje stymulację aktywności PARP-zależnego systemu naprawy DNA w komórkach normalnych i nowotworowych.
- Opisanie szeregu receptorowych i niereceptorowych mechanizmów działania kwasu L- i D-mlekowego zwiększającego oporność komórek nowotworowych na chemioterapeutyki (zwiększenie potencjału naprawczego DNA w komórkach, indukcja białek BRCA1, Nibrin, DNA-PKcs, białka oporności wielolekowej ABCB1/Pgp).

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

- Sumaryczny impact factor : **59,108**
- Liczba cytowań publikacji według bazy WoS: **185**
- Sumaryczna punktacja 24 publikacji według kryteriów MNiSW: **515**
- Indeks Hirscha według bazy WoS: **9**

Pozostałe osiągnięcia naukowe

Swoją pracę naukową rozpocząłem w zespole prof. dr hab. W. Agnieszki Fogel w roku 1997. W początkowym okresie zaangażowany byłem w badania dotyczące metabolizmu amin biogennych na modelu szczura z uszkodzeniem wątroby. Następnie pracowałem samodzielnie nad projektem, którego celem było scharakteryzowanie układu histaminowego w gruczole sutkowym myszy. W realizacji tego celu pomogło mi grant promotorski przyznany przez Komitet Badań Naukowych w 2000 zatytułowany „Układ histaminowy w gruczole mlecznym myszy. Odpowiedź na blokowanie ekspresji genu dekarboksylazy histydynowej” (6P05A 067 21; promotor: prof. W.A. Fogel). Prowadzone przez Zespół Metabolizmu ZAB PAN od kilku lat badania nad układem histaminowym w mysim gruczole mlekowym wykazały, iż histamina jest stałym i ważnym składnikiem tkanki gruczołowej we wszystkich stanach funkcjonalnych (*Maśliński i wsp., Comp Biochem Physiol C 1993; Maśliński i wsp., Inflamm Res 1997*). W zrealizowanym przeze mnie projekcie udało mi się scharakteryzować układ histaminowy w gruczole sutkowym myszy na poziomie komórkowym i na poziomie funkcjonowania całego narządu oraz prześledzić jego aktywność w przebiegu cyklu reprodukcyjnego myszy. Stosując techniki immunohistochemiczne wykazałem obecność histaminy i enzymu syntetyzującego histaminę (dekarboksylazę L-histydyny; HDC) w populacji komórek tucznych i w komórkach nabłonkowych, tworzących struktury pęcherzykowe gruczołu mlekowego. Komórki nabłonkowe gruczołu charakteryzowały się najwyższą ekspresją białka HDC w okresie ciąży. W warunkach *in vitro*, ekspresję białka HDC potwierdzono w komórkach nabłonkowych

niezróżnicowanych, wykazujących aktywność mitotyczną. Udokumentowałem, iż aktywność HDC i zawartość histaminy w komórkach nabłonkowych w warunkach *in vitro* zmienia się w rytm przemian morfologicznych zachodzących w gruczole w okresie ciąży i laktacji. Najwyższy poziom aktywności enzymu w 2 tygodniu ciąży odpowiada okresowi największego przyrostu masy gruczołu w okresie ciąży. Komórki nabłonkowe wyizolowane z 10-12 dnia ciąży również wykazywały największą dynamikę sekrecji histaminy do środowiska. Zaobserwowane zmiany aktywności HDC i poziomu histaminy w komórkach *in vitro* korelowały zarówno ze zmianami aktywności układu histaminowego *in vivo*, jak i tempem procesów fizjologicznych zachodzących w gruczole, sugerując zaangażowanie histaminy w proces dojrzewania gruczołu mlekowego i przygotowania narządu do podjęcia właściwej funkcji laktacyjnej. Badania farmakologiczne receptorów histaminowych w gruczole mlekowym myszy wykazały obecność receptorów typu H₁ w gruczole spoczynkowym, ciążowym i laktacyjnym, sugerując rozmieszczenie receptora H₁ głównie na komórkach nabłonkowych. Przeprowadzone badania molekularne gruczołu mlekowego spoczynkowego i ciążowego wykazały obecność mRNA dla receptorów H₁ i H₂. W gruczole sutkowym oprócz receptora H₁ i H₂ zidentyfikowano również receptor typu H₃. Obecność receptorów histaminowych na komórkach nabłonkowych gruczołu mlekowego może świadczyć o auto-/parakrynowej regulacji i modulacji rozwoju i dojrzewania gruczołu mlekowego. Zaproponowany model ograniczenia syntezy histaminy poprzez hamowanie specyficznej dekarboksylazy L-histydynowej za pomocą oligonukleotydów antysensownych wobec mRNA HDC, umożliwił częściowe zweryfikowanie tezy o roli wydzielanej lokalnie przez komórki nabłonkowe histaminy w regulacji prawidłowego wzrostu, różnicowania i funkcjonowania gruczołu. Otrzymane wyniki badań *in vivo* umożliwiły zbudowanie hipotezy o występowaniu indukowalnej HDC w ciążowym gruczole mlekowym i brak takiej regulacji w gruczole spoczynkowym. Efektem tych prac jest szereg publikacji (Wagner i wsp., *Inflamm Res* 2001;

Wagner i wsp., Inflamm Res 2002; Wagner i wsp., Inflamm Res 2003; Wagner i wsp., J Physiol Pharmacol 2003; Wagner i wsp., Amino Acids 2004) oraz praca doktorska (Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Wydział Lekarski 2003)

Począwszy od 2004 roku rozpocząłem pracę w Pracowni Immunologii Komórkowej Centrum Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi pod kierownictwem prof. dr hab. Jarosława Dastycha. W latach 2004-2011 byłem jednym z głównych wykonawców projektów "Fluoryzujący „Cell Chip” – (FCC) – wdrożenie nowej technologii do wykrywania substancji immunotoksycznych i immunomodulujących" (PBZ-MIN-007/P04/2003) oraz "Biosensory komórkowe dla zautomatyzowanego monitoringu zanieczyszczeń środowiskowych" finansowany ze środków Mechanizmu Finansowego Europejskiego Obszaru Gospodarczego oraz Norweskiego Mechanizmu Finansowego (PL0107), zakończone dwoma publikacjami, w których byłem pierwszym autorem (*Wagner i wsp., Toxicol Lett 2006; Wagner i wsp., Toxicol In Vitro 2011*). W technologii Fluoryzujący Cell Chip zastosowano zmodyfikowane genetycznie komórki hodowane in vitro, które reprezentują różne rodzaje komórek regulujących odpowiedź odpornościową. Dzięki dokonanym modyfikacjom genetycznym (mysie limfocyty linii EL-4) komórki te reagują na kontakt z niebezpiecznymi substancjami zwiększeniem lub zmniejszeniem wytwarzania swoistej cytokiny wraz z fluoryzującym białkiem EGFP. To z kolei powoduje, że komórki zmniejszają lub zwiększają swoją fluorescencję. Zmiany takie można z łatwością obserwować w świetle ultrafioletowym. Celem tego projektu było zvalidowanie swoistej odpowiedzi komórek reporterowych (IL-2, IL-4, IL-10, IFN γ , β -actin) na związki immunotoksyczne o znanym profilu wywoływania odpowiedzi immunologicznej. Ponadto opracowałem metodę analizy dużej liczby próbek związków, miniaturyzując i automatyzując pomiar przy pomocy płytek 96-dołkowych i cytometru przepływowego Cytomix FC500 MPL. Dzięki tak opracowanej technologii FCC można obecnie identyfikować substancje chemiczne o działaniu immunotoksycznym oraz zastąpić testy

przeprowadzane z użyciem zwierząt laboratoryjnych. Celem drugiego projektu, w który byłem zaangażowany było wytworzenie technologii monitorowania skażeń środowiskowych opartej na baterii testów laboratoryjnych wykorzystujących jako biosensory żywe komórki (platforma FCC i OXIBIOS). Moim zadaniem było rozwinięcie platformy pomiarowej wykrywającej immunotoksyczność-FCC poprzez udoskonalenie i adaptację istniejących testów do potrzeb monitoringu środowiskowego. W badaniach walidacyjnych wykorzystałem standaryzowane pyły zbierane na terenie miasta, huty miedzi, pyły silnika Diesela i inne.

Tematyka badań immunologicznych, którą się w tym czasie zajmowałem obejmowała również badaniami nad fizjologią komórek tucznych. Wspólnie ze współpracownikami z Pracowni Immunologii Komórkowej wykazaliśmy, iż tymozyna $\beta 4$ i jej pochodne aktywują komórki tuczne (*Wyczółkowska i wsp., Peptides 2007*) oraz opisaliśmy w tych komórkach mechanizm regulacji czynnika transkrypcyjnego HIF1 α w warunkach niedotlenienia i pod wpływem substancji aktywujących komórki tuczne (jonomycyna i substancja P)(*Walczak-Drzewiecka i wsp., J Immunol 2008*).

W kolejnych latach uczestniczyłem w badaniach nad przeciwnowotworowym działaniem ekstraktów roślinnych z pigwowca i wiesiołka na komórki raka jelita grubego. W badaniach tych wykorzystałem swoją wiedzę na temat zjawiska apoptozy i cyklu komórkowego oraz posługiwałem się nowoczesnymi technikami badawczymi takimi jak wieloparametryczną analizą obrazu (high content screening) przy użyciu cytometru obrazowego oraz cytometru przepływowego. Rezultatem tych badań były dwie publikacje, w których mój wkład pracy był równorzędny z pracą pierwszego autora (*Gorlach i wsp., J Agric Food Chem 2011; Gorlach i wsp., Nutr Cancer 2011*).

W latach 2011-2017 obok głównego nurtu zainteresowań (Receptorowe i niereceptorowe oddziaływanie kwasu mlekowego na komórki nowotworowe oraz komórki związane z mikrośrodowiskiem guza) angażowałem się w liczne badania kolegów i koleżanek dotyczących

zagadnień z biologii komórek raka prostaty (*Piastowska-Ciesielska i wsp., Arch Med Sci 2013; Piastowska-Ciesielska i wsp., J Appl Biomed 2014*), oddziaływania oreksyn na komórki neuronalne (*Sokołowska i wsp., J Mol Neurosci 2014*), zjawiska krzyżowej reakcji na jabłka u osób cierpiących na pyłkownicę brzoźową (*Wagner i wsp., Ann Allergy Asthma Immunol 2016*) czy wreszcie udziału tubuliny beta 3 i 4 we wczesnych procesach zwłóknienia (*Wawro i wsp., Cell Signal 2017*).

Mam nadzieję, że udział we wszystkich powyższych projektach oraz spotkania i praca z wieloma wspaniałymi ludźmi, dały mi solidne podstawy do rozpoczęcia w pełni samodzielnej pracy naukowej.

Kierowanie międzynarodowymi lub krajowymi projektami badawczymi:

Efekt receptorowego oddziaływania L- i D-mleczanu na komórki raka szyjki macicy. Modulacja przez mleczan naprawy uszkodzeń komórkowego DNA wywołanych chemioterapeutykami. NCN-projekt OPUS nr DEC-2011/03/B/NZ4/00046. Okres realizacji 14.09.2012-13.09.2015. Kierownik projektu.

lub udział w takich projektach:

1. Projekt badawczy POIG 01.01.02-10107/09 "Badania mechanizmów molekularnych na styku organizm ludzki-patogen-czynniki środowiska (InterMolMed)", współfinansowany ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka. 2009 - 2013. Wykonawca projektu.

2. Projekt badawczy PL0107 "Biosensory komórkowe dla zautomatyzowanego monitoringu zanieczyszczeń środowiskowych" finansowany ze środków Mechanizmu Finansowego Europejskiego Obszaru Gospodarczego oraz Norweskiego Mechanizmu Finansowego. Instytut Biologii Medycznej PAN w Łodzi. Styczeń 2008 - kwiecień 2011. Wykonawca projektu.

3. Projekt badawczy MEiN Nr 2 P04A 034 30 „ Działanie interleukiny-4 na ekspresję i aktywność DNA-zależnej kinazy białkowej w komórkach eukariotycznych” 05.05.2006 - 04.05.2009. Centrum Biologii Medycznej PAN w Łodzi. Wykonawca projektu.

4. Projekt badawczy zamawiany PBZ-MIN-007/P04/2003 "Fluoryzujący „Cell Chip”-(FCC) – wdrożenie nowej technologii do wykrywania substancji immunotoksycznych i immunomodulujących " 14.11.2003-13.11.2006.Centrum Biologii Medycznej PAN w Łodzi. Wykonawca projektu.

5. Projekt badawczy MNiI Nr 2 P05A 089 26. "Funkcja czynnika transkrypcyjnego HIF-1 w procesach degranulacji i regranulacji komórek tucznych" 22.03.2004-21.03.2006.

Centrum Biologii Medycznej PAN w Łodzi. Wykonawca projektu.

6. Grant promotorski 6P05A 067 21 „Układ histaminowy w gruczole mlecznym myszy. Odpowiedź na blokowanie ekspresji genu dekarboksylazy histydynowej” 2001-2003. Zakład Amin Biogennych PAN w Łodzi. Główny wykonawca projektu.

Uczestnictwo w programach europejskich i innych programach międzynarodowych lub krajowych:

POIG - InterMolMed POIG. 01.01.02-10-107/09 Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka, Priorytet 1, Badania i rozwój nowoczesnych technologii, Działanie 1.1.2 Strategiczne programy badań naukowych i prac rozwojowych.

Badanie mechanizmów molekularnych na styku organizm ludzki - patogen - czynniki środowiska (InterMolMed). Okres realizacji: 01.01.2010-31.12.2013, wykonawca zadania.

Udział w konferencjach

Prezentujący lub uczestnik i współautor prezentacji (21).

- 7th Szeged International Workshop on Advances in Nanoscience 12-15.10.2016. Szeged, Węgry.
- V Konferencja Biologii Molekularnej, Łódź 07-09.04.2016.
- FENS featured Regional Meeting, 7-10.10.2015, Saloniki, Grecja.
- Conference of the Polish Histamine Research Society “Biogenic Amines and Related Biologically Active Compounds”, Lodz, Poland, 2000; 2002; 2004; 2006; 2014
- XVIII Gliwice Scientific Meetings, Gliwice, 21-22.11.2014
- 52 Zjazd PTCh I SITPChem Łódź, 2-16.09.2009.
- 44 Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Łódź, 16-19.09.2009
- Biosensory komórkowe. III Krajowy Kongres Biotechnologii, Poznań, 9-12.09.2007
- 42nd Congress of European Societies of Toxicology – Eurotox 2005, Kraków, Polska, 11-14.09.2005.
- Polyamines Symposium 22-26.05 2004, Trento, Włochy
- 8th Int Congress on Amino Acids and Proteins, 5-9.09.2003, Rome
- Annual Meeting of the European Histamine Research Society, 2000; 2001; 2002; 2003; 2004

Otrzymane nagrody i wyróżnienia

- Nagroda uznaniowa I stopnia Dyrektora Instytutu Biologii Medycznej PAN, 12.10.2017
- Druga nagroda: Best poster presentation contest, XVIIIth Gliwice Scientific Meetings, Gliwice, 21-22.11.2014
- Stypendium od European Histamine Research Society, dofinansowanie uczestnictwa w XXX zjeździe EHRS w Turku 9-12.05.2001

Staże w zagranicznych lub krajowych ośrodkach naukowych lub akademickich

1. Szkolenie z zakresu biologii molekularnej, Akademia Rolniczo-Techniczna w Olsztynie, Polska, lipiec - sierpień 1998.
2. Szkolenie z zakresu biologii molekularnej w Abo Akademi University, Turku, Finlandia, styczeń - luty 1999.

Praca recenzencka (8 recenzji)

Przygotowałem szereg recenzji manuskryptów dla czasopism: Oncotarget (1), DNA Repair (1), Cell Communication and Signaling (2), OncoTargets and Therapy (2), International Journal of Nanomedicine (1).

Członkostwo w towarzystwach naukowych

Polskie Towarzystwo Badań nad Histaminą (PTBH), członek od 1998-2018, członek komisji rewizyjnej

Osiągnięcia dydaktyczne i w zakresie popularyzacji nauki:

Opieka na przebiegiem i realizacją części doświadczalnej prac doktorskich (promotor prof. dr hab. J. Dastyh)

- Dr Wojciech M. Ciszewski, Instytut Biologii Medycznej PAN/Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, 2014.
„Wpływ inhibitora DNA-zależnej kinazy białkowej NU74441 na przeżywalność komórek raka piersi narażonych na działanie czynników uszkodzających DNA”

Opieka na przebiegiem i realizacją części doświadczalnej prac magisterskich

- Mgr Michał Teodorowicz, Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, 2006 (promotor Dr Z.M. Kiliańskiej/prof. dr hab. J. Dastyh)

„Cytokiny jako sygnał stresu komórkowego”

- Mgr Magdalena Zimoń, Politechnika Łódzka, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, 2008 (promotor Dr E. Gendaszewska-Darmach/prof. dr hab. J. Dastyh)

„Zastosowanie Real-Time PCR w badaniach nad ekspresją genów związanych ze ścieżkami transdukcji sygnału”.

Osiągnięcia w zakresie popularyzacji nauki:

- Przygotowanie i prowadzenie warsztatów dla uczniów szkół podczas Dni Otwartych w IBM PAN w ramach Festiwalu Nauki.